

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平10-501813

(43)公表日 平成10年(1998)2月17日

(51) Int.Cl. <sup>*</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
A 6 1 K 38/43	ADV	9051-4C	A 6 1 K 37/465	ADV
38/00		9455-4C	39/395	N
38/21		8615-4C	45/00	
38/22		9356-4H	C 0 7 K 16/18	
38/46		9356-4H	16/40	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-502338
(86) (22)出願日	平成7年(1995)6月8日
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)12月13日
(86)国際出願番号	PCT/US95/07305
(87)国際公開番号	WO95/34319
(87)国際公開日	平成7年(1995)12月21日
(31)優先権主張番号	08/260, 850
(32)優先日	1994年6月16日
(33)優先権主張国	米国 (U.S.)

(71)出願人	ジェネンテク・インコーポレイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア94080-4990 サウス・サン・フランシスコ、ボイント・サン・ブルノ・ブルバード460番
(72)発明者	ベハール、ゴードン・エイ アメリカ合衆国94070カリフォルニア州サン・カルロス、レスリー・ドライブ110番
(74)代理人	弁理士 青山 葦 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腫瘍処置のための組成物および方法

(57)【要約】

本発明は凝血促進剤と、好ましくはTNF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ および/またはIL-1であるサイトカインとの治療的有効量を投与することによる腫瘍成長阻害方法および/または腫瘍後退導法に関する。特定的な側面の一つにおいては、本発明はトロンボモジュリン阻害剤とサイトカインとの治療的有効量を投与することによる腫瘍処置法に関する。さらに、本発明はトロンボモジュリン阻害剤とこれらの処置の過程で使用する医薬的組成物とに関する。

【特許請求の範囲】

1. 凝血促進剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効用量を患者に投与することを含む患者における腫瘍の処置法。
2. 凝血促進剤を組織因子、第IXa因子、第VIIa因子および第Xa因子から構成される群から選択する請求項1の方法。
3. 凝血促進剤が組織因子または第IXa因子である請求項2の方法。
4. トロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効用量を患者に投与することを含む患者における腫瘍の処置法。
5. 投与が同時的である請求項4の方法。
6. トロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤とが単一の医薬的製剤中において投与される請求項5の方法。
7. 投与が逐次的である請求項4の方法。
8. トロンボモジュリン阻害剤を最初に投与し、続いてサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤を投与する請求項7の方法。
9. サイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤を最初に投与し、続いてトロンボモジュリン阻害剤を投与する請求項7の方法。
10. 逐次の投与2回の間の時間が約3から8時間である請求項8または9の方法。
  11. 時間が約3から6時間である請求項10の方法。
  12. 患者がヒトである請求項4の方法。
  13. トロンボモジュリン阻害剤が、活性部位が遮断、変更または欠失されたトロンビンである請求項12の方法。
  14. トロンボモジュリン阻害剤が活性部位を共有結合試薬によって遮断したヒトのトロンビンである請求項13の方法。
  15. 共有結合試薬がトリペプチドクロロメチルケトンである請求項14の方法。
16. ケトンがD-PheProArgクロロメチルケトンである請求項15

の方法。

17. ケトンがD-Ty r P r o A r gクロロメチルケトンである請求項15の方法。

18. サイトカインをTNF- $\beta$  (LT)、TNF- $\alpha$ 、IL-1およびIFN- $\gamma$ から構成される群から選択する請求項13の方法。

19. プロテインC系の他種阻害剤の投与をさらに含む請求項4の方法。

20. 阻害剤が抗プロテインCモノクローナル抗体である請求項19の方法。

21. 別種抗腫瘍剤の投与をさらに含む請求項4の方法。

22. 抗腫瘍剤が抗腫瘍内皮細胞イムノトキシンである請求項21の方法。

23. 凝血促進剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効量を含む、患者における腫瘍処置のための組成物。

24. トロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効用量を含む、患者における腫瘍処置のための組成物。

25. トロンビンを不活性化せずにトロンビンのトロンボモジュリン結合部位に特異的に結合することのできる抗体。

26. トロンボモジュリンのトロンビン結合部位に特異的に結合することのできる抗体。

27. トロンボモジュリン／トロンビン複合体に特異的に結合することができるが、トロンビンには本質的に結合できない抗体。

28. 請求項25～27のどれか一つに相当する抗体を分泌することのできるハイブリドーマ細胞系列。

## 【発明の詳細な説明】

### 腫瘍処置のための組成物および方法

#### 発明の分野

本発明は腫瘍の処置のための組成物および方法に関する。さらに具体的には、本発明はトロンボモジュリン阻害剤のような凝血促進剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せを投与することによって、微小脈管構造を持つ(microvascularized)腫瘍の成長阻止および／または後退を起こさせる方法に関する。

#### 発明の背景

トロンボモジュリンはプロテインC抗凝固系の一員であつて(Walker, F. J. と Fay, P. J. 、FASEB J. 、6巻: 2561~2567頁[1992年] ; Esmon, C. T. 、Trends in Cardiovascular Med. 、2巻: 214~219頁[1992年] )、毛細血管床の第一次天然抗凝固系として役立つ(NydaHL, S. など、Thrombosis Res. 、65巻: 365~376頁[1992年] ; NydaHL, S. など、Thromb. Haemost. 、69巻: 41~44頁[1993年] )。この系の既知の構成員は、活性化された時にはこの抗凝固経路の中心的酵素となるビタミンK依存性蛋白質であるプロテインC、プロテインS(別のビタミンK依存性蛋白質)、C4結合蛋白質、トロンボモジュリンおよびトロンビンである。図1に図示したようにこれらの蛋白質は複雑な様式でこの系における別の構成員と反応してプロテインCの活性化を誘導する。内皮細胞上に存在する肝要な膜蛋白質であるトロンボモジュリンはトロンビンを結合してプロテインCの活性化を触媒する複合体を形成することによって機能すると信じられる。生理学的には、遊離のトロンビンはフィブリン形成、血小板活性化、および第V因子、第VIII因子および第XIII因子の活性化を包含する多数の凝血促進活性を持つが、しかしプロテインCを活性化することはできない。トロンボモジュリンが一旦結

合すると、トロンビンはその凝血促進機能全部を喪失し、トロンビン／トロンボ

モジュリン複合体はいまや特異的な Arg/Lys 結合においてプロテインCの活性化を効果的に触媒する。切断は立体配座の変化を招来し、それで機能的セリンプロテアーゼを与える。次に活性化プロテインCはプロテインSおよび磷脂質表面と共同して、第V凝固因子および第VIII凝固因子の蛋白分解的な不活化を触媒する。第V因子および第VIII因子の不在下には凝固経路は機能できず、フィブリンは形成しないことになる。抗凝固剤として機能することに加え、活性化プロテインCは線維素溶解も促進しうる (de Fouw, N. J. など、「フィブリノーゲン、血栓症、凝固および線維素溶解 (Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation and Fibrinolysis)」、CY·LiuとS. Chien編、235~243頁 [1990年])。この作用は活性化プロテインCとプラスミノーゲン活性化阻害剤1 (PAI-1)との間の複合体形成を含む (Sakata, Y. など、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻: 1121~1125頁 [1985年]; Sakata, Y. など、Blood、68巻: 1218~1223頁 [1986年]; de Fouw, N. J. など、Thromb. Haemost.、57 (2)巻: 176~182頁 [1987年])。

血液凝固の負の制御におけるこのプロテインC系および、殊にプロテインCとトロンボモジュリンとの重要な役割はよく証明されており、凝固に向かう平衡の移動が危機的結末の可能性がある重篤な病理学的症状を生じさせうることが知られている。プロテインCの欠乏は静脈血栓症および組織壊死の危険性増加と関連付けられている。プロテインCを適切に活性化しないと敗血症ショックにおける病理学的損傷に寄与するかも知れないことも示唆されており、また活性化プロテインCが敗血症ショックの早期段階の処置に有用であると提唱されている (Taylorなど、J. Clin. Invest.、79巻: 918~925頁 [1987年]; Esmon、J. Biol. Chem.、264巻: 4743~4746頁 [1989年]; Esmon, C. T. 、Trends in Cardiovasc. Med.、2巻: 214~219頁 [1992年])。

血液凝固と癌との間の関係は高度に論議されている。癌患者における止血異常

が認識されてから久しい。血栓症および凝固過剰は60%に達する悪性腫瘍患者について報告されている (Glassmanなど、Ann. Clin. Lab. Sci.、24巻：1～5頁 [1994年] ) 一方で、他者は癌患者の約15%が時々血栓症の症候を著すことに注目している (Scates、Sem. Thromb. Hemost.、18巻：373～379頁 [1992年] )。フィブリンの沈着は、たとえば肺小細胞癌 (SCLC)、腎細胞癌 (RCC) および悪性メラノーマのような種々の固体癌で観察された (ConstantiniとZacharski、Thromb. Haemost.、69巻：406～414頁 [1993年] )。腫瘍を持つ実験動物における腫瘍の進行を邪魔する抗血栓症剤 (抗凝血剤および抗血小板剤) の性能に基づいて、血液凝固反応がある種の型の癌の成長および拡散に寄与すると提唱されている (Zacharski、Haemostasis、16巻：300～320頁 [1986年] )。ワルファリンおよびヘパリンのようなある種の抗凝血剤はヒトでの臨床試験においてSCLCの進行過程に好ましい効果を及ぼすことが証明された (Zacharskiなど、Fibrinolysis、6巻：39～42頁 [1992年] およびその引用文献)。

腫瘍治療におけるある種の抗凝固剤の有益性に関する報告とは対照的に、C.T. EsmonとP.C. Comp (1992年9月15日発行の米国特許第5147638および1991年2月21日発行のPCT出願公表WO91/0153) はプロテインC抗凝固系のある種の阻害剤が単独またはサイトカインおよび/または抗腫瘍剤投与との組合せにおいて腫瘍成長に顕著な阻害効果を及ぼし、多数の症例で劇的な腫瘍後退を起こしたことを記載した (1992年9月15日発行の米国特許第5147638)。これら著者は実験的にプロテインC中和抗体 (HPC4) が広範に血液凝固を起こし、続いて広範な種類の腫瘍内で壊死を起こすことおよび正常組織の脈管構造には影響しないままのこの効果は高度に特異的であることを発見した。これら著者は特に腫瘍を持つ動物をプロテインC中和抗体 (HPC4) で処置すると腫瘍サイズの劇的な低下を招来することおよび

ある種の腫瘍においてサイトカインの一種である腫瘍壊死因子（TNF）の共投与によってこの効果が強化されることを証明した。

#### 発明の要約

本発明は、不活性トロンビンまたはリンホトキシンの単独ではなく、リンホトキシン（LT、TNF- $\beta$ ）と不活性トロンビンとを組合せて投与すると、腫瘍を持つ動物では腫瘍への血流の完全かつ選択的な喪失を招来することを証明した実験に基づく。そこでこれは正常組織細胞のいずれにも有意な損傷を与えることなく、腫瘍成長の実質的に完全な阻害を起こす。不活性（活性部位遮断）外来トロンビンは活性な内在トロンビンとトロンボモジュリンとの間の複合体形成の阻害剤であるので、プロテインCは不活性な、チモーゲン型のままに残存する。すなわちこの処置はプロテインC系の完全な閉塞を招来するものと信じられる。これに加え、不活性トロンビンはプロテインC抗体よりもさらに強い凝血促進性の刺激を発生する。プロテインC抗体とともに、形成されるいかなるトロンビンも毛細管床中でトロンボモジュリンに結合するとその凝血促進活性が中和される。トロンボモジュリンを不活性トロンビンで滴定する時には、微脈管構造はプロテインCを活性化する性能ならびにトロンボモジュリンとの複合体形成を経てトロンビンの凝血促進活性を中和する性能の双方を喪失する。

これに加えて本発明は腫瘍脈管構造の同様に選択的な崩壊およびその結果として起きる腫瘍成長の阻害が凝血促進状態を誘導する別種の薬剤とサイトカインとを組合せて投与することによって達成できるとの実験的発見に基づく。殊に、われわれは第IXa因子とTNF- $\beta$ との組合せおよび組織因子とTNF- $\beta$ との組合せが腫瘍を持つ動物において腫瘍への血流の完全に選択的な喪失を招来することを発見した。

悪性腫瘍の処置において抗凝固剤の有効性を立証する広範な生物医学的文献を参考すると、たとえばトロンボモジュリン阻害剤、第IXa因子および組織因子のように凝血促進性の状態を誘発する化合物が腫瘍の処置に有用であることは全く予想できなかつたことである。さらにその上、C. T. EsmonとP. C. Comp、前出、によって報告された結果を参照すると、不活性トロンビン単独

では腫瘍への血流に有意な効果を及ぼさず、その一方ではサイトカイン（L T）との組合せにおける不活化トロンビンの投与が腫瘍内へ成長している毛細血管の実質的に完全な閉塞を投与後数時間以内に招来し、その結果として劇的な腫瘍後退を導くことは驚異的である。

一側面では、本発明は凝血促進剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効量を患者に投与することを包含する患者の腫瘍を処置する方法に関する。この投与は同時的でもよく、凝血促進剤またはサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤のいずれを最初に投与する順次的でもよい。患者は好ましくはヒトである。好適な態様では、凝血促進剤は組織因子であるかまたは第 I X a 因子またはその組合せであり、サイトカインは TNF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 および／または IFN- $\gamma$  であり、TNF- $\beta$  が最適である。この処置はプロテイン C 系成分の 1 個またはそれ以上の阻害および／または他の既知腫瘍処置法との組合せでありうる。

別の側面では、本発明はトロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効量を患者に投与することを包含する患者における腫瘍の処置法に関する。この投与は同時的でもよく、トロンボモジュリン阻害剤またはサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤のいずれを最初に投与する順次的でもよい。患者は好ましくはヒトである。好適な態様では、トロンボモジュリン阻害剤は活性部位遮断、変換（すなわちアミノ酸置換または挿入による）または欠失トロンビン（これらは集合的に「不活化トロンビン」と称する）分子であって、最適には活性部位残基 1 個またはそれ以上におけるまたはその周辺における部位特異的突然変異誘発により修飾したトロンビン分子を TNF- $\beta$  (L T)、TNF- $\alpha$ 、IL-1 および／または IFN- $\gamma$  との組合せにおいて投与する。さらに好適な態様ではこのサイトカインは TNF- $\beta$  である。この処置はプロテイン C 系の別成分 1 個またはそれ以上の阻害および／または他種の既知腫瘍処置法と組合せうる。

なお別の側面では、本発明は凝血促進剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効量を包含する、患者における腫瘍処置のための

組成物に関する。

さらに別の側面では、本発明はトロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との組合せの治療的有効量を包含する、患者における腫瘍処置のための組成物に関する。

さらに別の側面では、本発明はトロンボモジュリンのトロンビン結合部位に特異的に結合することのできる抗体に関する。

なお、さらに別の側面では、本発明はトロンビン／トロンボモジュリン複合体に特異的に結合することができるが、トロンビンには本質的に結合することができない抗体に関する。

本発明はさらに前記抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系列に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1 (Esmon, C. T., Science, 235巻: 1348~1352頁 [1987年]) はプロテインC抗凝固経路の構成員間の知られている相互作用を図示する。使用する略号は次の通りである: PC=プロテインC、S=プロテインS、TM=トロンボモジュリン、Th=トロンビン、APC=活性化プロテインC、VIIIa=活性化第VIII因子、VIIIa<sub>Inactive</sub>=不活性第VIII因子、Va=活性化第V因子、Va<sub>Inactive</sub>=不活性第V因子、C4BP=C4結合蛋白質、PSBP=プロテインS結合蛋白質。

図2 A～Dは活性部位遮断トロンビンおよびTNF-βでの処置に対するマウス固形腫瘍の反応を示す。正常皮下皮膚組織ならびに移植腫瘍の血管を倒立顕微鏡を使用して連続的に観察した。図A～Dは処置前(図2A)と処置後(図2B～D)の記載した時点とに撮影した写真である。

#### 本発明の詳細な記載

##### A. 定義

用語「腫瘍」と「癌」とは互換的に使用され、その文法的変形とともに、ヒトおよびブタ、ネコ、イヌおよび高等靈長類を包含するいずれの非ヒト動物種の癌腫、肉腫、リンパ腫、および白血病を包含するいずれの細胞型の腫瘍をも示す。本発明の方法および組成物は殊に種々の細胞型における癌腫、肉腫およびリンパ

腫を包含する広範な脈管構造（微細脈管構造腫瘍）によって特徴付けられる固形腫瘍の処置に適当である。このような腫瘍はフィブリンカプセルに取り囲まれており、内皮細胞の迅速な増殖、貧弱な壁構造、血漿蛋白質に対する透過性増大、および必要性に反応して血流を増加させる性能の低下によって特徴付けられる広範な脈管構造を含有する。これに限定するものではないが、殊に本発明の処置が標的とする固形腫瘍には、肺癌、扁平上皮細胞および類表皮の癌を包含する頭部と頸部の癌、前立腺癌、硬性癌、および乳腺癌を包含する腺癌、リンパ肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、軟骨腫、その他を包含する。本方法は現在有効な治療方法がない播種性固形腫瘍の治療において殊に価値がある。

用語「凝血促進剤」は本明細書では凝血促進活性を持つか、または凝血促進状態を誘導することのできるいずれの化合物をも示す。この用語は在来の起源から精製されたか、化学的に合成されたか、または組換えDNA技術により產生されたか、またはこれらおよび／または他種の方法の組合せのいずれかによって製造されたかに関わらず、必要な凝血促進活性または凝血促進状態を产生する性能を持つことを条件として、ポリペプチド、ペプチドおよび有機分子を特異的に包含する。決してこれらに限定はされないが、このような「凝血促進剤」には第IXa因子、組織因子、第VIIa因子および第XIa因子を包含する。

用語「トロンボモジュリン」はヒトを包含する哺乳類種などのいかなる動物のいかなる細胞（これには微小循環および大循環の内皮細胞を包含する）内に発現された在来のトロンボモジュリンをも記載するために使用される。在来のヒトトロンボモジュリンの完全なcDNA配列およびアミノ酸配列はトロンボモジュリン遺伝子の染色体上の位置とともに知られている（Dittmanなど、Biochemistry、26巻：4350～4357頁[1987年]；Jackmanなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻：6425～6429頁[1987年]；Suzukiなど、EMBO J.、6巻：1891～1897頁[1987年]）。ヒトトロンボモジュリンcDNAはN-末端に高度に疎水性でシステインに乏しくトリプトファン豊富なドメイン、続いてEGF様反復6個を持つドメイン、おそらくO-結合でグリコシル化されたセ

リン豊富でスレオニン豊富なセグメント、疎水性アミノ酸約23個の膜貫通ドメインおよびアミノ酸約38個の原形質内テイルから構成される約575アミノ酸の蛋白質をコードする (Emson, N. L., Proc. Haemost. Thromb., 9巻: 29~58頁 [1988年])。

用語「トロンビン」および「 $\alpha$ -トロンビン」は、例えばヒトを包含する哺乳類種などいかなる動物のいかなる細胞に発現されたものでもありうる在来プロトロンビンの切断で得られたものまたは組換えDNA技術の方法、化学的合成法、またはこれらの方法および／または他種の方法の組合せによって製造されたものでもりうる酵素的に活性なトロンビンを記載するために使用する。在来の配列のトロンビンの配列、結晶構造、機能および相互作用部位は当業界ではよく知られており、例えばBode, W. と Stubbs, M. T., Thromb. Haemost., 19巻: 321~333頁 (1993年) およびそこに引用されている文献に記載されている。

用語「トロンボモジュリン阻害剤」は本明細書では機能的なトロンビン／トロンボモジュリン複合体の形成を阻害するか、またはトロンビン／トロンボモジュリン複合体を特異的に認識し、阻害してプロテインCの活性化を阻止する化合物または処置を示すために使用する。この定義の関係において、「機能的なトロンビン／トロンボモジュリン複合体」は生体内で在来のトロンビンと在来のトロンボモジュリンとの間で形成される、プロテインCを活性化する性能によって特徴付けられる複合体である。

機能的なトロンビン／トロンボモジュリン複合体の形成は次の手法の1種またはそれ以上によって阻止できる：(i) トロンボモジュリンの生体内発現を阻害すること、(ii) トロンビンへの結合からトロンボモジュリンを選択的に遮断すること、(iii) トロンボモジュリンとの結合からトロンビンを選択的に遮断すること、および(iv) トロンビン／トロンボモジュリン複合体を選択的に遮断すること。但し、手法(i)を適用するなら、これには必ず方法(ii)～(iv)の少なくとも1つを組合せるものとする。

トロンボモジュリンの生体内発現は、例えばトロンボモジュリンの産生および

発現をダウンレギュレーションすることが知られているIL-1、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ およびトロンビンによって阻害できる。腫瘍内の内皮細胞上のトロンボモジュリン発現は放射線による処置の結果としてもダウンレギュレーションされうる。腫瘍床に放射される約100～300ラド用量のX線照射は腫瘍に緩和な局所的炎症を起こすに十分であって、これがトロンボモジュリン発現の喪失に誘導するものと期待される。

トロンボモジュリンは中和抗体によってまたはトロンボモジュリンのトロンビン結合部位の単数または複数に選択的に結合することのできる他種のいかなる化合物（有機分子、ペプチドおよびポリペプチドを含む）によっても遮断できる。トロンボモジュリンの主要なトロンビン結合ドメインは分子内の第5および／または第6EGF様反復上に存在するとされている（Kuro sawaなど、J. Biol. Chem.、263巻：5993～5996頁[1988年]；Zushiなど、J. Biol. Chem.、264巻：10351～10353頁[1989年]）が、しかしながらこの分子の第一N末端ドメインもEGF様領域の安定化によって、またはそうでなければトロンビン結合部位の正常な立体配座に寄与することによってトロンビン結合に寄与しているかもしれない（Esmon, N. L.、前出；Jackmanなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83巻：8834～8838頁[1986年]；Wenなど、Biochemistry、26巻：4350～4357頁[1987年]）。トロンボモジュリンを遮断する迅速な方法は在来のトロンボモジュリンへの結合性能を保持しているが活性部位が修飾、欠失または遮断されたトロンビン（不活性トロンビン）との反応である。トロンビンのこの不活性型はトロンボモジュリンには結合するが形成した複合体はプロテインCを活性化することができない。この様式によって不活性トロンビンを前投与することで脈管構造内に機能的なトロンビンが形成されるとトロンボモジュリンは全部が不活性型として除かれる。

トロンビンは、たとえばトロンビンのトロンボモジュリン結合部位への選択的な結合によってトロンビンを不活性化することなしにトロンビン／トロンボモジュリン相互作用を阻害することのできる、中和抗体またはその他の化合物（有機分

子、ペプチドまたはポリペプチド) によって選択的に遮断できる。トロンボモジュリン(ならびにフィブリノーゲン、トロンビン受容体、フィブリンおよびヒルジン) の結合に関する領域はB o d e とS t u b b s、前出、の図2に「F」と標識されている「フィブリノーゲン認識エキソ部位」内に見出されている。凝固経路の様々な構成員に対して同一のまたは重複した結合部位を使用するトロンビンの独特な性質はどのようにしてトロンビンの特異性が凝血促進から抗凝固にまで変化するかを説明する。トロンボモジュリンはトロンビンがその基質を認識するために使用して、プロテインC結合のための部位の作成を援助する部位上に結合する。従って、トロンビンの基質認識に必要な部位を中和することなしにトロンボモジュリン結合に必要な部位を中和することによってトロンビンを選択的に遮断できる。トロンボモジュリンによるトロンビンの相互作用を特異的に阻害するペプチドはSuzukiなど、J. Biol. Chem. 265巻: 13263~13267頁[1990年]; SuzukiとNishioka、J. Biol. Chem. 266巻: 18498~18501頁[1991年]およびNishiokaなど、J. Biochem. 114巻: 148~155頁[1993年]に開示されている。

トロンボモジュリン阻害の別法はトロンビン/トロンボモジュリン複合体および遊離のトロンビンそれぞれの結合特異性の相違に基づく。抗体またはその他の化合物(たとえば有機分子、ペプチド分子またはポリペプチド分子)を遊離のトロンビンは認識しないが、トロンビン/トロンボモジュリン複合体を特異的に認識して中和するように設計するかまたは確認できる。トロンビン/トロンボモジュリン複合体に対する親和性が異なるトロンビン自体に対する既知の阻害剤に基づいて、そのような分子はトロンビン阻害剤であるアルガトロバンに類似する小さい有機分子; 他種のトロンビン阻害剤であるヒルジンに似た小さな蛋白質; またはアンチトロンビンIIIに類似する大型の蛋白質ができる。

「抗体(Abs)」は特異的抗原(すなわち、トロンボモジュリンまたはトロンビン)に対して特異的な結合特異性を示す糖蛋白質である。

在来の抗体および免疫グロブリンは通常、同一の軽鎖(L) 2本と同一の重鎖

(H) 2本とから構成される約150000ダルトンのヘテロ4量体糖蛋白質である。各軽鎖はジスルフィド共有結合1個によって重鎖に結合するが、その一方では種々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間ではジスルフィド結合の数が変化している。各重鎖および軽鎖はまた規則的間隔の鎖内ジスルフィド橋を持っている。重鎖は一端に可変ドメイン(VH)を、続いていくつかの定常ドメイン(CH)を持っている。軽鎖は一端に可変ドメイン(VL)を、他端には定常ドメインを持ち、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインに並列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインに並列する。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖との可変ドメイン間の中間面を形成していると信じられている(Clothiaなど、J. Mol. Biol.、186巻：651～663頁[1985年]；NovotnyとHaber、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、82巻：4592～4596頁[1985年])。

用語「可変」は可変ドメインのある部分での配列が抗体の間で広範に相違し、特定の抗原に対する特定の抗体の結合および特異性に使用されるという事実を示す。しかしながら、この可変性は抗体の可変ドメイン全体にわたって均一に分布しているのではない。これは軽鎖と重鎖両方の可変ドメイン内にある相補性決定領域(CDR)または超可変領域と呼ばれるセグメント3個の中に濃縮されている。可変ドメインの中で比較的高度に保存されている部分はフレームワーク(FR)と呼ばれる。在来の重鎖および軽鎖両方の可変ドメインは各々FR領域4個を含み、主に $\beta$ -シート立体構造を取り、3個のCDRによって結合している。このCDRは $\beta$ -シート構造を結合するループを形成しているが、このループは場合によっては $\beta$ -シート構造の一部も構成する。各鎖のCDRはFR領域によって相互に近接する位置に保持され、他鎖のCDRと共に抗体の抗原結合部位形成に寄与する(Kabat, E. A. など、「免疫学的に重要な蛋白質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、米国国立衛生試験所、ベセスタ、MD[1991年]参照)。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接的には関与しないが、しかし、たとえば抗体依存性細胞障害性における抗体の寄与のような様々なエフェクター

機能を発揮する。

抗体のパパイン消化は、 $F_{ab}$ 断片と呼ばれ各々が抗原結合部位1個を持つ同一の抗原結合断片2個および容易に結晶する性能を反映する名称である「 $F_c$ 」断片と呼ばれる残余の断片を与える。ペプシン処理は抗原結合部位2個を持ち、なお抗原に交差結合することのできる $F_{(ab')2}$ 断片を与える。

「 $F_v$ 」は完全な抗原認識部位を含有する最小の抗体断片である。この領域は強固な非共有結合的会合をしている重鎖1個と軽鎖可変ドメイン1個との二量体から構成される。可変ドメインの各CDR3個が相互作用してVH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を決定するのはこの立体構造である。結局、6個のCDRが抗体に抗原結合特異性を与えている。しかしながら、完全な結合部位よりも親和性は低いが1個の可変ドメイン（または抗原に対して特異的なCDR3個のみを包含する $F_v$ の半分）でさえ抗原を認識して結合する性能を持つ。

$F_{ab}$ 断片は軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン（CH1）も包含する。 $F_{ab'}$ 断片は $F_{ab}$ 断片とは重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端にある抗体のヒンジ領域からのシステイン1個またはそれ以上を含む残基数個が付加している点で相違する。 $F_{ab'}-SH$ は本明細書では定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つ $F_{ab'}$ の表示である。 $F_{(ab')2}$ 抗体断片は最初は相互の間にヒンジのシステインを持つ $F_{ab'}$ 断片の対として產生された。抗体断片の別の化学的結合も知られている。

いずれの脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の軽鎖もその定常領域でのアミノ酸配列に基づいてカッパおよびラムダ（λ）と呼ばれる明瞭に識別される型2個の中の1個に割付けできる。

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンには5種の主要なクラスがある。すなわち、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMであり、これらのいくつかはさらにたとえばIgG-1、IgG-2、IgG-3およびIgG-4、IgA-1およびIgA-2などのサブクラス（アイソタイプ）に分割される。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはおのおのα、デルタ、イプシ

ロン、 $\gamma$ および $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および3次元立体構造はよく知られている。

用語「抗体」は本明細書では最広義に使用し、所期の生物学的性質を示す限り单一のモノクローナル抗体、ポリエピトープ的特異性を持つ抗体組成物ならびに抗体断片（たとえば、 $Fab$ 、 $F(ab')_2$ 、および $Fv$ など）を包含する。

用語「モノクローナル抗体」は本明細書では実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、すなわち集団を構成する個々の抗体が微量に存在する可能性があるかも知れない天然起源突然変異を除いて同一であるものを示すために使用する。モノクローナル抗体は単一な抗原部位に指向して高度に特異的である。さらにその上、典型的には異なる決定基（エピトープ）に対して指向する異なる抗体を包含する通常の（ポリクローナル）抗体製品とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は他の免疫グロブリンが夾雜しないハイブリドーマ培養によって合成される点で優れている。修飾詞「モノクローナル」は実質的に均一な抗体の集団から得られるものとしての抗体の性質を示すものであって、いかなる特定方法による抗体生産を要件とするとも解釈すべきでない。例えば、本発明に従って使用すべきモノクローナル抗体はKohlerとMilstein、Nature、256巻：495頁（1975年）に最初に記載されたハイブリドーマ法によつて製造されてもよく、または組換えDNA法によつて製造されてもよい〔たとえば米国特許第4816567（Cabillyなど）参照〕。

本明細書ではモノクローナル抗体は「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を所期の生物学的活性を示す限りにおいて特異的に包含する。この「キメラ」抗体は重鎖および／または軽鎖の一部を特定の種から誘導したか、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか同族であり、その一方では鎖の残余部分を別の種から誘導したか、または別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか同族であるもの、ならびにそのような抗体の断片（米国特許第4816567（Cabillyなど）；Morrisonなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、

1巻：6851～6855頁〔1984年〕）である。

非ヒト（たとえばマウス）抗体の「ヒト化」型は非ヒトの免疫グロブリンから由来する最小の配列を包含するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらの断片（たとえば $F_v$ 、 $F_{ab}$ 、 $F_{ab}'$ 、 $F_{(ab')2}$ 、またはその他の抗体の抗原結合性副次配列のような）である。殆どの場合、ヒト化抗体はヒトの免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、たとえば所期の特異性、親和性および性能を持っているマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種CDRからの残基によって置換されている。ある例においては、ヒトの免疫グロブリンの $F_v$ フレームワーク残基が対応する非ヒト残基によって置換される。さらにその上、ヒト化抗体にはレシピエント抗体中にも、輸入したCDRまたはフレームワーク配列中にも見当たらない残基も包含しうる。これらの修飾は抗体の性能を改善し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1個、典型的には2個の可変ドメインの実質的に全てを含有し、そこではCDR領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、およびFR領域の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリンの共通配列である。最適にはヒト化抗体は、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分を包含させる（さらに詳細についてはJonesなど、Nature、321巻：522～525頁〔1986年〕；Reichmannなど、Nature、322巻：323～329頁〔1988年〕；およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol.、2巻：593～596頁〔1992年〕を参照）。

「サイトカイン」は1つの細胞集団によって他の細胞に作用する細胞間介在物として放出される蛋白質のための一般的な名称である。天然腫瘍壊死因子- $\alpha$ および $\beta$ （TNF- $\alpha$ および- $\beta$ ）、たとえばIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ およびIFN- $\gamma$ のようなインターフェロン（IFN）、たとえばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、その他のようなインターロイキン（IL）、ヒト成長ホルモン（hGH）、N-メチオニルhGH

; およびウシG Hを含む成長ホルモン (G H) 、インスリン様増殖因子、副甲状腺ホルモン、サイロキシン、インスリン、プロインスリン、レラキシン、プロレラキシン、卵胞刺激ホルモン (F S H) 、甲状腺刺激ホルモン (T S H) および黄体化ホルモン (L H) のような糖蛋白質ホルモン、造血増殖因子、H G F、線維芽細胞増殖因子、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、ミューラー阻害物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、静脈内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエイチン、N G F- $\beta$  のような神経栄養因子、P D G F、T G F- $\alpha$  およびT G F- $\beta$  のようなトランスホーミング増殖因子 (T G F) 、インスリン様増殖因子-1 およびインスリン様増殖因子-2 (I G F-1 およびI G F-2) 、エリスロポエイチン、骨誘導因子、M-C S F、G M-C S F およびG-C S F のようなコロニー刺激因子 (C S F) 、およびその他ヒトおよび非ヒト動物種のポリペプチド性因子のいずれか、およびそれら在来の蛋白質の機能的誘導体がこのサイトカインに包含される。本発明の組成物および方法において有用なサイトカインは次の性質1種またはそれ以上を示すことによって特徴付けられる：凝血促進活性の刺激、ナチュラルキラー細胞 (N K) およびリンホカイン活性化キラー細胞介在細胞障害性の刺激、マクロファージ活性化、単核細胞上におけるF c受容体発現および抗体依存性細胞障害毒性 (A D C C) の刺激、およびH L A クラス I I 抗原発現の強化。好ましくは、本発明に従って使用されるべきサイトカインは凝血促進活性を刺激する性能を持つべきである。殊に参照されるサイトカインは単独または組合せにおいて、在来のT N F- $\alpha$  およびT N F- $\beta$  、インターロイキン-1 およびインターロイキン-2、インターフェロン- $\gamma$  、およびこれら在来蛋白質の機能的誘導体である。

ヒトおよび様々な動物のT N F- $\alpha$  のアミノ酸配列およびスクレオチド配列は当業界でよく知られている。T N F- $\alpha$  はPennicaなど、Nature、312巻：721頁（1984年）によって記載され、T N F- $\beta$  (L T) はGrayなど、Nature、312巻：724頁（1984年）に記載されている。明細書および請求項を通じて記載する用語「T N F- $\alpha$ 」は在来の腫瘍壊死因子- $\alpha$  (在来のT N F- $\alpha$ ) およびその機能的誘導体を示す。互換的に使用す

る「在来の腫瘍壞死因子- $\alpha$ 」と「在来のTNF- $\alpha$ 」とは天然に産出するヒトまたは非ヒト動物種いずれかのTNF- $\alpha$ ポリペプチドを示す。本明細書に使用する用語「在来のヒトTNF- $\alpha$ 」は1989年11月7日発行の米国特許第4879226および1994年2月22日発行の米国特許第5288852に開示されたアミノ酸配列を持つヒトのポリペプチドであって、開始メチオニンが存在するかまたは存在せず、N-末端に結合するシグナル配列が存在するかまたは存在しない天然起源からの精製品、合成品、組換えDNA技術による生産品またはこれらまたはその他の方法の組合せのいずれかによる製品を示す。

用語「腫瘍壞死因子- $\beta$ 」、「TNF- $\beta$ 」、「リンホトキシン」および「LT」は互換的に使用され、在来の腫瘍壞死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) とその機能的誘導体とを示す。用語「在来のTNF- $\beta$ 」は天然に産出するヒトまたは非ヒト動物種いずれかのポリペプチドを呼称する。「在来のヒトTNF- $\beta$ 」、「在来のヒトリンホトキシン」または「在来のヒトLT」は1990年4月24日発行の米国特許第4920196に開示されたヒトのポリペプチドであって、開始メチオニンが存在するかまたは存在せず、N-末端に結合するシグナル配列が存在するかまたは存在せず、随伴するグリコシル化が存在するか存在しない在来起源からの精製品、合成品、組換えDNA技術による生産品またはこれらまたはその他の方法のいずれかの組合せによる製品を示す。

本発明との関係において、用語「ガンマイインターフェロン」、「インターフェロンガンマ」および「IFN- $\gamma$ 」は互換的に使用し、在来のIFN- $\gamma$ およびその機能的誘導体を示す。用語「在来のIFN- $\gamma$ 」は天然に存在するヒトまたは非ヒト動物種のIFN- $\gamma$ を示すために使用する。用語「在来のヒトガンマイインターフェロン」、「在来のヒトイインターフェロンガンマ」および「在来のヒトIFN- $\gamma$ 」はその製造法に関わらず、Grayなど、Nature、295巻：503～508頁（1982年）および米国特許第4762791、4929544、4727138および4925793に開示されたアミノ酸配列を持つポリペプチドを示す。大腸菌内で產生されたGrayとGoeddelの組換えヒトIFN- $\gamma$ は分子のN-末端が配列Cys-Tyr-Cysで始まる146アミ

ノ酸から構成される。後に在来のヒトIFN- $\gamma$ （すなわち、ヒト末梢性血液リンパ球の有糸分裂促進剤誘導および後続する精製からのもの）はGrayなど、前出、が決定したCys-Tyr-Cys-N末端は欠失したポリペプチドであることが発見された。さらに最近、大腸菌由来組換えヒトIFN- $\gamma$ （rhIFN- $\gamma$ ）の結晶構造が決定され [Eallickなど、Science, 252巻: 698~702頁(1991年)]、この蛋白質は2個の同一ポリペプチド鎖が逆並行に向いて強く絡み合った非共有結合性のホモ2量体として存在することが証明された。

本発明との関係において、用語「インターロイキン-1」および「IL-1」は互換的に使用し、在来のインターロイキン-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) および在来のインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) およびそれらの機能的誘導体を包含する在来のIL-1ポリペプチドホルモンを集合的に示す。用語「在来のIL-1」は天然産のヒトまたは非ヒト動物種のIL-1を示すために使用する。用語「在来のヒトIL-1」はその製法には無関係に米国特許第4894333および第4879374に記載されたヒト起源の在来のIL-1 $\alpha$ および在来のIL-1 $\beta$ を示す。このIL-1 $\alpha$ 蛋白質とIL-1 $\beta$ 蛋白質とは両者とも最初は共通のリンパ球活性化因子活性およびそれらの活性化マクロファージにおける共通の存在に基づいてIL-1に分類された。けれども、現在ではこれらの構造的関連性は遠いことが知られており、それらに共通の生物学的活性を参考にして両者とも「IL-1」の用語に包含されている。

本明細書で使用する用語「サイトカイン産生誘導剤」は処置をすべき患者の体内におけるサイトカイン産生の誘導を起こす化合物または処置のいずれかを示す。次の性質中の1個またはそれ以上を持つサイトカインの産生を誘導することは好適である：凝血促進活性の刺激、ナチュラルキラー細胞（NK）介在性細胞障害性およびリンホカイン活性化キラー細胞介在細胞障害性の刺激、マクロファージ活性化、単核細胞上におけるFc受容体発現および抗体依存性細胞障害性（ADCC）の刺激、およびHLAクラスII抗原発現の強化。好ましくは、誘導されるサイトカインは凝血促進活性を刺激する性能を持つ。殊に好適なサイトカイン

はTNF- $\alpha$ およびTNF- $\beta$ 、インターロイキン-1およびインターロイキン-2、およびインターフェロン- $\gamma$ であり、最も好ましくはTNF- $\beta$ である。

在来ポリペプチドの「機能的誘導体」は在来のポリペプチドと共通な生物学的活性を定性的に持つ化合物である。例えば、在来のTNF- $\alpha$ またはTNF- $\beta$ ポリペプチドの機能的誘導体は各々在来のTNF- $\alpha$ およびTNF- $\beta$ と共通の生物学的活性を定性的に持つ化合物である。これらに限定するものではないが、「機能的誘導体」にはいずれかの動物種（ヒトを含む）からの在来のポリペプチドの断片、および在来（ヒトおよび非ヒト）のポリペプチドの誘導体およびその断片を含むが、但し各々在来のポリペプチドと共通の生物学的活性を持つものとする。「断片」は在来の成熟ポリペプチドの配列内の領域を包含する。用語「誘導体」はアミノ酸配列およびグリコシル化変異体、および在来のポリペプチドの共有結合性の修飾を定義するために使用するが、一方では用語「変異体」はこの定義の中のアミノ酸配列およびグリコシル化変異体を示す。機能的誘導体は対応する在来のポリペプチド配列との間に好ましくは少なくとも約65%のアミノ酸配列同一性、さらに好ましくは約75%のアミノ酸配列同一性、さらにお好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を持つポリペプチドである。既に知られている在来のTNF受容体2個の中で1個にのみ結合し、そのために対応する在来のTNF- $\alpha$ より低毒性であると期待されるTNF- $\alpha$ アミノ酸配列変異体は殊にTNF- $\alpha$ の機能的誘導体の定義内にある。86位のアミノ酸変換を持つこの変異体は欧州特許第563714に記載されている。

在来のポリペプチドおよびその機能的誘導体に関する同一性または相同性は本明細書では相同性の百分率が最大になるように配列を並べ、要すれば間隙を導入した後、配列同一性部分として保存性置換は考慮せずに、対応する在来のポリペプチドの残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義する。N-末端またはC-末端の延長も插入も、同一性または相同性を減じるものとは解釈しない。

本発明に従って投与されるべき在来のサイトカインの「機能的誘導体」の定義

に関連する「生物学的活性」は次の性質少なくとも1個を有するものとして定義される：凝血促進活性の刺激、ナチュラルキラー細胞（N K）介在細胞障害性およびリンホカイン活性化キラー細胞介在細胞障害性の刺激、マクロファージ活性化、単核細胞上におけるFc受容体発現および抗体依存性細胞障害毒性（ADC C）の刺激、およびHLAクラスII抗原発現の強化。サイトカインの生物学的活性は通常、例えばL929細胞またはその誘導細胞系列の殺菌に基づく検定法のような細胞障害性のよく確立された細胞検定法によって試験される。

用語「アミノ酸」は全ての天然に存在するL- $\alpha$ -アミノ酸を示す。この定義にはノルロイシン、オルニチンおよびホモシステインを含める意向である。アミノ酸は一文字または三文字表示で記述される：

A s p	D	アスパラギン酸	I l e	I	イソロイシン
T h r	T	スレオニン	L e u	L	ロイシン
S e r	S	セリン	T y r	Y	チロシン
G l u	E	グルタミン酸	P h e	F	フェニルアラニン
P r o	P	プロリン	H i s	H	ヒスチジン
G l y	G	グリシン	L y s	K	リジン
A l a	A	アラニン	A r g	R	アルギニン
C y s	C	システイン	T r p	W	トリプトファン
V a l	V	バリン	G l n	Q	グルタミン
M e t	M	メチオニン	A s n	N	アスパラギン

これらアミノ酸は化学的組成およびそれらの側鎖の性質に従って分類しうる。これらは広義には荷電および非荷電の2群に分類される。これらの群のおのおのをさらに正確にアミノ酸を分類するためのサブグループに分割する：

### I. 荷電アミノ酸

酸性残基：アスパラギン酸、グルタミン酸

塩基性残基：リジン、アルギニン、ヒスチジン

### II. 非荷電アミノ酸

親水性残基：セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン

脂肪族残基：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン

非極性残基：システイン、メチオニン、プロリン

芳香族残基：フェニルアラニン、チロジン、トリプトファン

用語「アミノ酸配列変異体」は対応する在来のポリペプチドまたはその断片と比較してアミノ酸配列が相違する分子を示す。通常、アミノ酸配列変異体は在来のポリペプチドのアミノ酸配列との間に少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約75%、さらに好ましくは少なくとも約85%、最も好ましくは少なくとも約95%の相同性を有するか、あるいは、対応する在来のポリペプチドの相補鎖とストリンジエント条件下にハイブリッド形成できるDNAによってコードされている。

置換変異体は在来の配列中のアミノ酸残基少なくとも1個が除かれて、その代わりに異なるアミノ酸が同じ場所に挿入されているものである。この置換は分子中のアミノ酸1個のみが置換された一重置換であるか、または同じ分子中のアミノ酸2個またはそれ以上が置換された多重置換でありうる。

挿入変異体は在来のアミノ酸配列の特定位置のアミノ酸に隣接して1個またはそれ以上のアミノ酸を挿入したものである。アミノ酸に隣接するとはアミノ酸の $\alpha$ -カルボキシまたは $\alpha$ -アミノ官能基のいずれかに結合することを意味する。

欠失変異体は在来のアミノ酸配列中のアミノ酸1個またはそれ以上を除いたものである。通常、欠失変異体は分子の特定領域中からアミノ酸1個または2個を除いたものである。

用語「グリコシリ化変異体」は対応する在来のポリペプチドのものと相違するグリコシリ化特性を持つ分子を示すために使用する。ポリペプチドのグリコシリ化は典型的にはN-結合またはO-結合のどちらかである。N-結合はアスパラギン残基の側鎖への炭水化物基の付着を示す。アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンのトリペプチド配列、この式中ではXはプロリン以外のアミノ酸のいずれかである、はアスパラギン側鎖への炭水化物基の酵素的付着に対する認識配列である。O-結合グリコシリ化は糖であるN-アセチルガ

ラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの中の1個のヒドロキシアミノ酸

、最も普通にはセリンまたはスレオニンへの付着を示すけれども、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもO-結合グリコシル化に関与しうる。在来の対応物と比較して変異体または断片中に存在する炭水化物基の位置および／または性質が相違するものもいずれも本明細書の範囲内に含まれる。

在来のポリペプチドのグリコシル化様式はHPLCクロマトグラフィー [Hardy, M. R. など、Anal. Biochem. 、170巻：54～62頁(1988年) ] 、グリコシル結合の構造決定用のメチル化分析 [Lindberg, B. 、Meth. Enzymol. 、28巻：178～195頁(1972年) ; Waeghe, T. J. など、Carbohydr. Res. 、123巻：281～304頁(1983年) ] ；NMRスペクトル術、質量スペクトル術、その他を含む分析化学で良く知られている技術によって決定できる。

「共有結合性誘導体」には在来のポリペプチドまたはその断片の有機蛋白質性または非蛋白質性誘導試薬での修飾、および翻訳後修飾を含む。共有結合性修飾は慣例的には標的アミノ酸残基を選択した側鎖または末端残基と反応することができる有機誘導試薬と反応させることによって、または選択した組換え宿主細胞中で機能する翻訳後修飾の利用機構によって導入される。ある種の翻訳後修飾は発現したポリペプチドへの組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミニルおよびアスパラギニル残基はしばしば対応するグルタミルおよびアスパルチル残基にまで翻訳後脱アミド化がなされる。これとは別に、これらの残基は緩和な酸性条件下に脱アミド化される。これらの残基のいずれの型も本発明で定義する在来のサイトカインポリペプチドの官能性誘導体中に存在しうる。その他の翻訳後修飾にはプロリンおよびリジンの水酸化、セリルまたはスレオニル残基の水酸基の燐酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化を含む [T. E. Creighton、「蛋白質：構造と分子的性状 (Proteins: Structure and Molecular Properties)」、W. H. Freeman社、サンフランシスコ、79～86頁(1983年) ] 。

用語「トロシボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導

剤（サイトカイン誘導剤）との組合せの治療的有効量」は本明細書ではトロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン誘導剤とが組合せで腫瘍の出血性壊死を起こす用量を示すために使用する。「有効な」処置は、好ましくは可視的な腫瘍の後退および患者の生活の質的改善を起こす。最も好ましくはこの処置は処置した患者の寿命に延長を起こす。

前記における用語「組合せ」はトロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との、同時的またはどちらかの順序での順次的な組合せ投与を意味する。もしトロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン誘導剤とを順次に投与するなら、各投与はこれらの成分がそれら各自の生物学的活性を重複する時間枠内に発揮するために十分に近接した時間に行うべきである。そこで前記で使用した用語「組合せ」はいずれかの順序でのトロンボモジュリン阻害剤とサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤との数時間（たとえば3～4時間）離れた順次的投与を特定的に包含する。

#### B. 好適な態様の詳細な記載

好適な態様の一つでは、固形の微小脈管構造腫瘍を持つと診断された患者を、活性部位を遮断したトロンビンおよび、たとえばリンホトキシン（LT）などのサイトカインで処置する。

トロンビンはプロトロンビンからたとえばMilletich, J. など、J. Biol. Chem. 253巻: 6908頁(1978年); Morita, T. など、J. Biochem. 79巻: 1091頁(1986年); Franza, R. B. など、J. Biol. Chem. 250巻: 7057-7068頁(1975年); Fenton, J. W. など、Biochim. Biophys. Acta 229巻: 26頁(1971年)に記載されているような種々の操作で製造できる。

トロンビンはよく特徴付けられているセリンプロテアーゼ族の一員である。これらの蛋白質は他の蛋白質のペプチド結合の切断を触媒し、共通の三次元構造を持つ。活性化および触媒能のために必須なアミノ酸の位置と機能とは確認されて

いる (Stroud, R. M. など、Ann. Rev. Biophys. Bio

eng.、6巻：177頁〔1977年〕；Bode, W. など、J. Mol. Biol.、118巻：99頁〔1978年〕；Kraut, J.、Annu. Rev. Biophys. Eng.、6巻：177頁〔1982年〕）。この族の全構成員は保存された触媒機構を持ち、His<sup>57</sup>、Asp<sup>102</sup>およびSer<sup>195</sup>から構成される重要な活性部位残基を持つ。認められた慣例に従ったこの番号付けはキモトリプシンのアミノ酸番号を基礎にしている。切断されるべき残基のための特異性は189位の残基によって提供される。血液凝固プロテアーゼの場合には189位の残基はアスパラギン酸であって、アルギニンまたはリジン残基において切断するこれらプロテアーゼの特異性を招来する。

本発明の基礎になる実験的研究で使用したトロンビンは実施例1に記載するようにして活性部位特異的試薬であるD-PheProArgクロロメチルケトン（PPACK）を使用することによって不活化した。しかしながら、たとえば、D-TyrProArgのクロロメチルケトン（YPACK、Bachem, Bioscience社、フィラデルフィア）などの他のトリペプチドのクロロメチルケトンおよび欧州特許第589741に開示されたトロンビン活性部位阻害剤などのような他の試薬も適当である。一般に、たとえばPPACK、YPACK、ジイソプロピルフルオロホスフェート、p-トルエンスルホニルシンクロロメチルケトンなどのようなトロンビンの活性部位残基と共有結合的に反応するいずれの試薬、またはトロンビンの活性部位と非共有結合的な、親和性の高い会合をすることのできる試薬によっても不活化を達成できるが、但し、得られるトロンビンはなおトロンボモジュリンに結合する性能を保持するものとする。

これとは別に、触媒的に不活性なトロンビン変異体は、たとえば在来のトロンビンまたは以前に製造されたトロンビン変異体をコードするDNAの部位特異的突然変異誘発などによる組換えDNA技術の技法によって作製できる。これは、例えば活性部位残基（His<sup>57</sup>、Asp<sup>102</sup>および／またはSer<sup>195</sup>）のいずれかを触媒作用を促進できないアミノ酸に変換することによって達成できる。これとは別に、結合ポケットを修飾できる：Asp<sup>189</sup>をGluまたは類似の残基に

変更することは、ArgまたはLys残基で切断できない（それ故プロテインC

を活性化することができない) がその一方でトロンボモジュリンへの結合性能を保持する分子を製造できる。トロンボモジュリン結合には影響しないが、基質の切断を妨害するはずのその他の残基は B o d e と S t u b b s 、前出、の総説の図 2 によって確認できる。このような突然変異 (アミノ酸置換) の単独またはその組合せも本発明の範囲内にある。

次にトロンボモジュリン結合性能には影響ないがトロンビンの触媒機能を妨害する置換について確認されている部位および領域は通常、たとえば (1) 最初に保存的選択について置換すること、次に達成された結果に依存してさらに積極的な選択について置換すること、(2) 標的残基単数または複数を欠失すること、または (3) 存在部位に隣接して同一または異なるクラスの残基を挿入することまたは前記選択 1 ~ 3 の組合せなどによって系統的に修飾される。

有利な技術の一つは「アラニンスキャンニング」と称される (Cunningham と Wells, Science, 244巻: 1081~1085頁 [1989年] ) 。ここでは標的残基の残基または基を確認し、アラニンまたはポリアラニンで置換する。アラニン置換に機能的感受性を示すこれらのドメインを次にアラニン置換の部位においてまたはその部位に対してさらにまたは他の置換基を導入することによって精密に改良する。

所期の突然変異を確認した後には、所期の変異体をコードする遺伝子を Engels と Uhlmann, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28巻: 716頁 (1989年) に記載された方法の一つを使用する化学合成によって取得できる。これらの方法にはトリエステル、ホスファイト、ホスホロアミダイトおよび H - ホスホネート法、PCR およびその他の自動プライマー法、および固体支持体上でのオリゴヌクレオチド合成法を包含する。

より好ましくは、トロンビンの所期活性部位遮断アミノ酸配列変異体をコードする DNA は以前に製造された変異体またはトロンビン分子の非変異体をコードする DNA の部位指向突然変異誘発によって製造される。部位指向性 (部位特異的) 突然変異誘発は所期突然変異の DNA 配列ならびに十分な数の隣接ヌクレオ

チドをコードする特定のオリゴヌクレオチド配列の使用により、対象となるべき

欠失結合の両端に安定な二本鎖を形成するに十分なサイズおよび配列複合性を持つプライマー配列を与えることによってトロンビン変異体の产生を可能にする。典型的には変更すべき配列の結合両端上にある約5から10残基を持つ長さ約20から25ヌクレオチドのプライマーが好適である。一般に部位特異的突然変異誘発の技術はEdeImanなど、DNA、2巻：183頁（1983年）のような記載に例示されるように当分野ではよく知られている。理解されるように、部位特異的突然変異誘発の技術は典型的には単鎖型と二重鎖型との双方で存在するファージベクターが採用される。部位特異的突然変異誘発において有用な典型的なベクターには、例えばMessingなど、「第3回巨大分子および組換えDNAに関するクリーブランドシンポジウム（Third·Cleveland·Symposium·on·Macromolecules·and·Recombinant·DNA）」、A.Walton編、Elsevier社、アムステルダム（1981年）などに開示されているようにM13ファージのようなベクターを包含する。これおよびその他のファージベクターは商業的に入手可能であり、その使用法は当業者にはよく知られている。M13一由来ベクターを使用するDNA断片におけるオリゴデオキシリボヌクレオチドに指向する部位特異的突然変異の構築に向けた多用途で効率的な操作法はZoller, M. J.とSmith, M.、Nucleic·Acids·Res.、10巻：6487～6500頁[1982年]）に記載された。また、単鎖ファージの複製開始点を含むプラスミドベクター（Veiraなど、Meth. Enzymol.、153巻：3頁[1987年]）は単鎖DNAを得るために採用しうる。これとは別に、ヌクレオチド置換は試験管内で適切なDNAを合成し、これを当分野で知られているPCR操作法によって増幅することによっても導入される。

一般に、ここで部位特異的突然変異誘発は最初に、関連する蛋白質をコードするDNA配列を配列内に含む単鎖ベクターを得ることによって実施する。所期の突然変異配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーを、一般には例えばCreaなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、75巻：5765頁

（1978年）の方法などによって合成的に製造する。次にこのプライマーを单

鎖蛋白質配列含有ベクターにアニーリングし、たとえば大腸菌ポリメラーゼ I クレノフ断片のようなDNAポリマー化酵素反応に付して突然変異含有鎖の合成を完成させる。こうして一方の鎖は元の非突然変異配列をコードし、第二の鎖が所期の突然変異を持つヘテロ二本鎖が形成される。次にこのヘテロ二本鎖ベクターを使用してJP101細胞のような適当な宿主細胞を形質転換し、突然変異配列の配置を持つ組換えベクターを包含するクローンを選択する。その後に、突然変異領域を採取し、適当な発現ベクター内に入れて蛋白質生産を行いうる。

PCR技術もトロンビン分子のアミノ酸配列変異体を作るために使用しうる。PCRにおいて出発材料として少量の鑄型DNAを使用する時には、鑄型DNAにおける対応する領域からの配列とわずかに異なるプライマーを使用してプライマーが鑄型とは異なる場所でのみ鑄型配列とは異なる特異的DNA断片を比較的大量に作製するために使用できる。プラスミドDNAに突然変異を導入するために、一方のプライマーは突然変異の位置上に重なって突然変異を含有する。他方のプライマー配列はプラスミドの対合鎖の配列の伸長に同一でなければならないのであるが、この配列はプラスミドDNAに沿ういかなる場所に位置することもできるように設計する。しかしながら、第二プライマー配列が第一プライマー配列から200ヌクレオチド以内に位置し、最終的にプライマーが結合したDNAの増幅された全領域を容易に配列決定できるようにすることは好適である。ここに記載したようにプライマー対を使用するPCR增幅法はプライマーが規定する突然変異の位置で、および鑄型を複写することには幾分誤謬が出る傾向があるので可能性としては別の位置でも、相違するDNA断片の集団を与える。

生成物に対する鑄型の比率が極端に低ければ、殆ど大多数の生成物DNA断片は所期の突然変異を導入されている。この生成物物質は標準的DNA技術を使用するPCR鑄型として利用されたプラスミド中の対応する領域を置換するために使用される。離れた場所における複数の突然変異は第二の突然変異プライマーを使用すること、または第二のPCRを異なる突然変異プライマーで実施することおよび得られるPCR断片2個を三部分（またはそれ以上）連結法によって同時

的にベクター断片に連結することによって、同時的に導入できる。

PCR突然変異誘発の特定的実例の一つに於ては、鑄型プラスミドDNA ( $1\text{ }\mu\text{g}$ ) を増幅すべき領域の外に存在するプラスミドDNA中に特有な認識部位を持つ制限エンドヌクレアーゼで消化することによって線状化する。この物質中の100ngをデオキシヌクレオチド三磷酸4種を含有するPCR緩衝液を含むPCR混合物に添加し、GeneAmp (商標) キット (Perkin-Elmer・Cetus社、ノーウォーク、CTおよびエマービル、CAから入手) に入れ、25ピコモルの各オリゴヌクレオチドプライマーを最終容積が $50\text{ }\mu\text{L}$ になるように添加する。この反応混合物の上に鉛油 $35\text{ }\mu\text{L}$ を層積する。反応物を $100^{\circ}\text{C}$ で5分間変性し、氷上に暫く置き、次にPerkin-Elmer・Cetus社、ノーウォーク、CTおよびエマービル、CAから購入したThermus・aquaticus (Taq) DNAポリメラーゼ (5単位/ $\text{L}$ )  $1\text{ }\mu\text{L}$ を鉛油層の下に添加する。次にDNA・Thermal・Cycler (Perkin-Elmer・Cetus社から購入) を次の通りにプログラムして反応混合物を注入する：

2分間、 $55^{\circ}\text{C}$ 、  
30秒間、 $72^{\circ}\text{C}$ 、続いて次を19サイクル：  
30秒間、 $94^{\circ}\text{C}$ 、  
30秒間、 $55^{\circ}\text{C}$ 、および  
30秒間、 $72^{\circ}\text{C}$ 。

プログラム終了後に、反応バイアルをサーマルサイクラーから取り出し、水層を新しいバイアルに移し、フェノール／クロロホルム (50:50%容積) で抽出し、エタノールで沈降し、DNAを標準的操作法によって回収する。この物質を繰り返してベクターに挿入するための適切な処置に付する。

トロンビンの活性部位遮断置換変異体を製造するための別方法であるカセット突然変異誘発はWellsなど [Gene、34巻：315頁 (1985年)] が記載した技術に基づく。出発物質は突然変異さるべきトロンビンDNAを含有するプラスミド (またはベクター) である。トロンビン分子内にある突然変異すべきコドンを確認する。確認した突然変異部位の両側には特有な制限部位がなけ

ればならない。もしそのような制限部位が存在しなければ、前記のオリゴヌクレオチド介在突然変異誘発法を使用してそれらをトロンビンDNA中の適切な位置に作製する。プラスミドに制限部位を導入した後にプラスミドをこれらの部位で切って線状化する。制限部位間のDNA配列はコードするが、しかし所期の突然変異を包含する二本鎖オリゴヌクレオチドを標準的操作法を使用して合成する。これら鎖2本は別々に合成し、次に標準的技術を用いて相互にハイブリッド形成させる。この二本鎖オリゴヌクレオチドをカセットと呼称する。プラスミドに直接連結できるよう、このカセットは線状化したプラスミドの両端に適合する3'および5'末端を持つように設計する。そこでこのプラスミドは突然変異したトロンビンDNA配列を含む。

これに加えて、所謂ファージミド表示法は在来型または変異体トロンビン分子のアミノ酸配列変異体を作るのに有用なこともある。この方法には（イ）突然変異されるべきトロンビンをコードする第一の遺伝子、在来型または野生型ファージのコート蛋白質の少なくとも一部をコードする第二遺伝子（なおここに第一および第二遺伝子が異種のものとする）、および第一および第二遺伝子に作動可能に結合する転写制御エレメントを含有して、融合蛋白質をコードする融合遺伝子を形成する、複製可能な発現ベクターを構築すること、（ロ）第一遺伝子内にある選択された位置の1ヶ所またはそれ以上においてベクターを突然変異させて関連プラスミドの一群を形成すること、（ハ）このプラスミドで適当な宿主細胞を形質転換すること、（ニ）このファージコート蛋白質をコードする遺伝子を持つヘルパーファージに形質転換した宿主細胞を感染させること、（ホ）プラスミドの少なくとも一部を含有し、宿主を形質転換することのできる組換えファージミド粒子を形成するために適当な条件の下にこの形質転換した感染宿主細胞を培養すること（ただしこの条件をファージミド粒子の微量以上が粒子の表面上に融合蛋白質の1コピー以上を表示しないように調整する）、（ヘ）ファージミド粒子の少なくとも一部が抗原に結合するようにファージミド粒子を適当な抗原と接触させること、および（ト）結合したファージミド粒子を結合しないファージミド

粒子から分離すること、を包含する。段階（ニ）から段階（ト）までは1回また

はそれ以上反復できる。好ましくはこの方法でのプラスミドは転写制御エレメントの強力な統制下にあり、培養条件は粒子表面上の融合蛋白質の1コピー以上を表示するファージミド粒子の量または数が約1%以下になるように調整する。また好ましくは、融合蛋白質1コピー以上を表示するファージミド粒子の量は融合蛋白質を1個表示するファージミド粒子の量の10%以下である。最も好ましくは、この量は20%以下である。典型的には、この方法では発現ベクターはさらにポリペプチドの各サブユニットをコードするDNAに融合する分泌シグナル配列を含み、転写制御エレメントはプロモーター系である。好適なプロモーター系はlac-Z、tac、T7ポリメラーゼ、トリプトファンおよびアルカリホスファターゼのプロモーターおよびそれらの組合せから選択する。また、正常にはこの方法はM13KO7、M13R408、M13-VCSおよびPhi-X・174から選択したヘルパーファージを採用する。好適なヘルパーファージはM13KO7であり、好適なコート蛋白質はM13ファージ遺伝子III外套蛋白質である。好適な宿主は大腸菌および大腸菌のプロテアーゼ欠失株である。

前記および類似の突然変異誘発技術のさらに詳細については一般的な教科書、例えばSambrookなど、「分子クローニング：実験室便覧（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory出版社、ニューヨーク、1989年および「最新分子生物学実験講座（Current Protocols in Molecular Biology）」、Ausbelなど編、Greene出版社およびWiley-Interscience社、ニューヨーク、1991年に見出される。

これとは別にトロンボモジュリンへの結合能力は保持するが触媒的に不活性なトロンビン変異体は、前記技術の一つまたはそれ以上によって変更することにした触媒部位残基またはその他の残基または領域1個またはそれ以上を欠失することによって調製できる。在来トロンビンの欠失変異体はトロンビン分子中にアミノ酸置換を作るために前記した部位特異的突然変異誘発法に実質的に従って調製

できる。これに加えて、Sambrookなど、前出、の15、3章に記載のよ

うにしてDNAの制限エンドヌクレアーゼ消化に続けて連結を使用することによって活性部位欠失トロンビン変異体を作製しうる。この方法を使用するにはプラスミドベクター中に外来DNAを挿入するのが好ましい。挿入したDNAおよびベクター双方の制限地図は知られなければならない。挿入したDNAには、ベクターには存在しない特有な制限部位がなければならぬ。次に酵素生産者が示唆する条件下に制限エンドヌクレアーゼを使用してこれらの特有な制限部位の間で消化することによって挿入したDNA中に欠失を作る。制限酵素が平滑断端または適合する末端を創出するなら、Sambrookなど、前出、の1. 68章に記載のようにバクテリオファージT4DNAリガーゼのようなりガーゼを使用して混合物をATPおよびリガーゼ緩衝液の存在下に16°Cで1~4時間インキュベーションすることによってその末端を直接相互に連結できる。もし両端が適合していないければ、まずDNAポリメラーゼIのクレノフ断片またはバクテリオファージT4のDNAポリメラーゼを使用して、両者とも消化したDNAの一本鎖突出末端に充填するデオキシリボヌクレオチド三磷酸4種を必須とするが、平滑にしておかなければならぬ。あるいはいずれもDNAの突出一本鎖刈込の機能をするヌクレアーゼS1または緑豆ヌクレアーゼのようなヌクレアーゼを使用して両端を平滑にすることもある。次にリガーゼを使用してDNAを再連結する。得られる分子はトロンビンの活性部位欠失変異体である。

アミノ酸挿入が触媒的には活性がないがトロンボモジュリンに結合することのできるトロンビン変異体を与えることもある。挿入変異体を構築するためにはSambrookなど、前出、の15. 3章に記載のように欠失変異体の構築に類似した方策を使用しうる。特有な制限部位でプラスミドベクター（外来DNA）に挿入したDNAの消化後に、オリゴヌクレオチドを外来DNAを切断した部位に連結する。このオリゴヌクレオチドは挿入すべき所期のアミノ酸をコードするように、またそれに加えて消化した外来DNAの両端に適合する5'および3'末端を持って直接連結が可能なように設計する。さらに好ましくは、トロンビンの挿入変異体は置換変異体の製造について本質的に前記した在来のトロンビンま

たはトロンビン変異体をコードするDNAの部位特異的突然変異誘発によって行

われる。

活性部位遮断または欠失トロンビン変異体をコードする核酸が入手できると、一般にこれを複製可能な発現ベクター中に連結し、さらにクローニングする（DNAの増幅）か、または発現する。

発現およびクローニングベクターは当業界でよく知られており、選択した宿主細胞1種またはそれ以上の中でベクターを複製することを可能にする核酸配列が含まれる。適当なベクターの選択は1)それをDNA増幅のため、またはDNA発現のため、のいずれに使用するか、2)ベクター中に挿入するDNAのサイズおよび、3)そのベクターで形質転換すべき宿主細胞、に依存するものである。各ベクターはその機能（DNAの増幅またはDNAの発現）および適合性のある宿主細胞に依存して種々の成分を含有する。これに限定するものではないが一般に、ベクター成分には次のもの一種またはそれ以上を包含する：シグナル配列、複製開始点、マーカー遺伝子1個またはそれ以上、エンハンサー要素、プロモーターおよび転写終結配列。クローニングおよび発現ベクターおよびその成分は商業的に入手可能であって、例えば米国特許第5190756（1993年3月2日発行）、第5156969（1992年10月20日発行）、第5270198（1993年12月14日発行）のような多数の出版物中に開示されている。原核生物および真核生物の宿主細胞（微生物および多細胞生物を含む）および活性部位遮断トロンビン変異体の組換え產生に適当なクローニング方策も知られている（たとえば、前記複数の米国特許、Sambrook、前出、およびAusbelなど編、前出、参照）。

もしトロンボモジュリン阻害剤がトロンボモジュリンのトロンビン結合部位に特異的に結合することのできる抗体であるか、またはトロンビンのトロンボモジュリン結合部位に選択的に結合することのできる抗トロンビン抗体であるがトロンビンを不活化しないものであるか、またはトロンビン-トロンボモジュリン複合体を特異的に認識して中和する抗体であるが遊離のトロンビンを認識して中和しないものであるならば、これは当業界でよく知られている方法によって製造でき

る。

一般に、ポリクローナル抗体は抗原（たとえばトロンビンまたはトロンビン／トロンボモジュリン複合体）とアジュバントとの多回皮下（s.c.）または腹腔内（i.p.）注射によって動物中に発生する。標的アミノ酸配列を含有する抗原または断片を、たとえばキーホールリンペッドヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリンまたは大豆トリプシン阻害剤などの免疫すべき種に免疫原である蛋白質と、例えばマレイミドベンゾイルスルホサクシンイミドエステル（システィン残基を介する複合酸無水物）、N-ヒドロキシサクシンイミド（リジン残基を介する）、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物、SOC12、またはR<sup>1</sup>N=C=NR（ここにRおよびR<sup>1</sup>は異なるアルキル基である）などの二官能性試薬または誘導体化試薬を使用して複合することが有用なこともある。

免疫原複合体または誘導体に対して複合体1mgまたは1μg（各々ウサギまたはマウスに対して）をフロイントの完全アジュバント3容と混合し、この溶液を動物の多数部位に皮内注射することによって免疫する。1ヶ月後に複合体のフロイント完全アジュバント溶液を初回量の1/5から1/10までを多数部位に皮下注射することによって動物を追加免疫する。7から14日後に動物から採血し、血清の抗体力価を検定する。力価が安定するまで動物を追加免疫する。好ましくは、同じ抗原であるが、しかし別の蛋白質および／または別の交差結合試薬に複合したもので動物を追加免疫する。複合体は融合蛋白質として組換え細胞の培養で製造することもできる。また明礬のような凝集剤も免疫反応を強化するために使用される。

モノクローナル抗体は実質的に均一な抗体の集団、すなわち集団を形成する各抗体が微量に存在しうる天然起源突然変異を除いて同一である抗体の集団から得られる。こうして修飾辞「モノクローナル」は異なる抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。

例えば、本発明の抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体はKohlerとMilstein、Nature、256巻：495頁（1975年）によって最初に記載されたハイブリドーマ法を使用して作りうるし、または組換えDNA

法 (Cabillyなど、米国特許第4816567) によって製造することもある。

このハイブリドーマ法においては、マウスまたは、たとえばハムスターのようなその他の適当な宿主動物を前記のように免疫し、免疫に使用した蛋白質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか産生することのできるリンパ球を誘導する。これとは別にリンパ球を試験管内で免疫することもある。次にリンパ球を、たとえばポリエチレングリコールのような融合試薬を使用し、骨髄腫細胞に融合してハイブリドーマ細胞を形成する [Goding、「モノクローナル抗体：原理と実際 (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)」、59~103頁、(Academic Press社、1986年)]。

こうして製造したハイブリドーマ細胞を好ましくは非融合親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する物質 1 種またはそれ以上を含有する適当な培養培地中に接種し成長させる。例えば、もし親骨髄腫細胞がヒポキサンチングアニンホスホリボシル転移酵素 (HGPRT または Hprt) を欠失するなら、典型的にはハイブリドーマ用培養培地にはヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを添加して (HAT 培地) 、これらの物質が HGPRT 欠失細胞の成長を防止する。

好適な骨髄腫細胞は効率的に融合し、選択した抗体生産細胞による安定で高いレベルでの抗体発現を維持し、HAT 培地のような培地に対して感受性があるものである。これらの中で好適な骨髄腫細胞系列はたとえば Salk Institute · Cell · Distribution · Center、サンジェゴ、カリホルニア、米国から入手可能な MOPC-21 および MPC-11 マウス腫瘍から誘導されたもののようなマウスの骨髄腫細胞系列および American · Type · Culture · Collection、ロックビル、メリーランド州、米国から入手可能な SP-2 細胞である。ヒトの骨髄腫およびマウスヒト異種骨髄腫細胞系列もヒトのモノクローナル抗体生産について記載されている [Kozbor、J. Immunol.、133巻：3001頁 (1984年) ; Brodeurなど、「モノクローナル抗体生産技術および応用 (Monoclonal Antibody Production Technology and Application)」、10

nal · Antibody · Production · Techniques · and · Applications)」、51~63頁 (Marcel · Dekker社、ニューヨーク、1987年)】。

ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地を所期抗原（たとえばトロンビン）に指向するモノクローナル抗体の生産について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞が生産するモノクローナル抗体の結合特異性をたとえば免疫沈降法または放射線免疫検定法（RIA）または酵素免疫吸着測定法（ELISA）のような試験管内結合検定法によって決定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonとPollard、Anal. Biochem.、107巻：220頁（1980年）のスキヤッチャード分析によって決定できる。

ハイブリドーマ細胞が所期の特異性、親和性および／または活性を持つ抗体を產生することを確認した後、クローンを限界希釈法によってサブクローニングして、標準法によって成長させうる。Goding、「モノクローナル抗体：原理と実際（Monoclonal · Antibodies: Principles · and · Practice）」、59~103頁、（Academic · Press社、1986年）。この目的のために適當な培養培地には、例えばダルベッコの修正イーグル培地またはRPMI-1640培地を含む。これに加えて、ハイブリドーマ細胞は動物の腹水腫瘍として生体内で成長させうる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は培養培地、腹水または血清から、例えばプロテインAーセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーのような通常の免疫グロブリン精製操作法によって適宜分離される。

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは常法（たとえば、マウスの抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）を使用して容易に分離して、配列決定できる。本発明のハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの好適な源泉として役立つ。一旦分離すると、このDNAは発現ベクターに入れることができ、

次にこれを、たとえばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵胞（CHO）細胞または骨髄腫細胞のような普通は免疫グロブリン蛋白質を產生しない宿主細胞中に遺伝子移入して組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成する。このDNAはまた、例えば対応するマウス配列の代わりにヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインをコードする配列で置換することによって、Morrisonなど、Proc. Natl. Acad. Sci.、81巻：6851頁（1984年）、または非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列の全部または一部を免疫グロブリンをコードする配列に共有結合的に結合することによって、修飾しうる。この方法で「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が製造されるが、これは本明細書のモノクローナル抗体の結合特異性を持つ。

典型的にはそのような非免疫グロブリンポリペプチドは本発明の抗体中にある定常ドメインに置換するか、またはこれらを本発明の抗体にある抗原結合部位の一つの可変ドメインに置換して、その中和がトロンボモジュリン阻害を起こす抗原に特異性を持つ抗体結合部位1個および異なる抗原に対する特異性を持つ別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を製造する。

キメラまたはハイブリッド抗体は試験管内で交差結合試薬に関するものを包含する合成蛋白質化学における既知の方法を使用しても調製しうる。例えばイムノトキシンをジスルフィド交換反応を使用してまたはチオエーテル結合を形成することによって構築しうる。この目的のための適当な試薬の例にはイミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートを包含する。

採用しうる当分野で知られている検出しうる基に抗体を別個に結合する技術にはHunterなど、Nature、144巻：945頁（1962年）；Davidなど、Biochemistry、13巻：1014頁（1974年）；Painなど、J. Immunol. Meth.、40巻：219頁（1981年）；およびNygren J. Histochem. and Cytochem.、30巻：407頁（1982年）によって記載された方法はいずれも包含する。

本発明の抗体は、たとえば競合的結合検定法、直接的または間接的サンドウィ

ツチ検定法および免疫沈降検定法のような、既知の検索方法のいずれにおいても採用しうる。Zola、「モノクローナル抗体：技術便覧（Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147~158頁（CRC・Press社、1987年）。

非ヒト抗体をヒト化する方法は当技術分野でよく知られている。一般に、ヒト化抗体はヒト以外の源泉から導入するアミノ酸残基1個またはそれ以上を持つ。これら非ヒトアミノ酸残基はしばしば「輸入」残基と呼称され、典型的には「輸入」可変ドメインから得られるものである。ヒト化は本質的にWinterとその協力者の方法 [Jonesなど、Nature、321巻: 522~525頁 (1986年) ; Riechmannなど、Nature、322巻: 323~327頁 (1988年) ; Verhoevenなど、Science、239巻: 1534~1536頁 (1988年) ] に従って、嚙齒類のCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって実行できる。従って、このような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であって (Cabilly、前出) 、そこでは無処理のヒト可変ドメインよりも実質的に小さいものが非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的には、CDR残基のあるものと可能性としてはFR残基のあるものとが嚙齒類抗体中にある類似部位からの残基によって置換された、ヒトの抗体である。

抗体は抗原に対する高度な親和性およびその他の好都合な生物学的性質を保持したままでヒト化することが重要である。この目標を達成するために好適な方法に従えば、親配列およびヒト化配列の3次元モデルを使用して親配列および種々の着想上のヒト化生成物を分析して、その過程によってヒト化抗体を調製する。3次元免疫グロブリンモデルは普通に入手でき、当業者は精通している。選択した候補免疫グロブリン配列の推測上の3次元立体構造を描写し、表示するコンピュータープログラムが入手可能である。これらの表示を検討することによって、候補免疫グロブリン配列が機能する際の残基の推測的役割の分析、すなわちその候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響する残基の分析、が可能である。

る。この方法で F R 残基を選択し、共通配列および輸入配列に結合して、たとえば標的抗原に対する親和性増加のような所期の抗体特性が達成される。一般に C D R 残基は直接的におよび最も実質的に抗原結合への影響に関与している。さらに詳細については 1994 年 3 月 3 日公表の P C T 出願公表、 W O 94/04679 参照。

これとは別に現在、免疫によって内在的な免疫グロブリン産生の不在下にヒト抗体の全レパートリーを產生することができるトランスジェニック動物（たとえばマウス）を生産することが可能である。例えば、キメラおよび生殖細胞系列突然変異マウスにおける抗体重鎖結合部位（JH）遺伝子のホモ接合体の欠失が内在性抗体産生の完全な阻害を招くことが報告されている。このような生殖細胞系列突然変異マウスへのヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子群の移植は抗原のチャレンジによってヒト抗体の产生を招来すると思われる。たとえば Jakobovits など、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 卷 : 2551~2555 頁 (1993 年) ; Jakobovits など、 Nature, 362 卷 : 255~258 頁 (1993 年) 参照。

双特異性抗体は本発明の方法におけるトロンボモジュリン阻害剤としても使用しうる。双特異性抗体はモノクローナルな、好ましくはヒトのまたはヒト化された抗体であって少なくとも 2 個の異なる抗原に対する結合特異性を持つものである。本件の場合、結合特異性の一方は、例えばトロンボモジュリンのトロンビン結合部位に対するものであり、他方はトロンビン-トロンボモジュリン複合体に対するものでありうる。双特異性の抗体を造る方法は当分野で知られている。慣例的には、双特異的抗体の組換え產生は重鎖 2 個が異なる特異性を持つ免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペア 2 個の共発現に基づくものである (Milstein と Cuello, Nature, 305 卷 : 537~539 頁 (1983 年) )。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな組合せの故に、これらのハイブリドーマ (quadroma) は異なる抗体分子 10 種類の混合物を产生する可能性があるが、その 1 種のみが正しい双特異的構造を持つ。正しい分子の精製は通常は親和性クロマトグラフィーで行われるがかなり煩雑であって、生成物の収率は

低い。同様な操作はPCT出願公表WO93/08829(1993年5月13日公表)およびTrauneckerなど、EMBO、10巻：3655～3659頁(1991年)に開示されている。これとは異なるもっと好適な手法に従えば、所期の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を持つ抗体の可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。この融合は好ましくはヒンジ、CH2およびCH3領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。融合の少なくとも一部の中に軽鎖の結合に必要な部位を含有する重鎖の第一定常領域(CH1)を持つのは好適である。免疫グロブリン重鎖融合および、要すれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別の発現ベクターに挿入し、および適当な宿主生物中に共遺伝子移入する。構築で使用するポリペプチド鎖3個の不均一な比率が最適な収率を与える態様においてこれがポリペプチド鎖断片3個の不均一な相互の比率を調製するために大きな柔軟性を提供する。しかしながら、等しい比率のポリペプチド少なくとも2個の発現が高収率を招く時またはこの比率が特別の意味を持たない時には発現ベクター1個の中にポリペプチド鎖2個または全3個についてのコード配列を挿入することが可能である。この手法における好適な態様において、双特異的抗体は腕の一つに第一の結合特異性を持つ免疫グロブリン重鎖ハイブリッドおよび別の腕に免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアのハイブリッド(第二の結合特異性を提供する)から構成される。この非対称構造が望ましくない免疫グロブリン鎖組合せから所期の双特異的化合物を分離することが促進することが発見された。これは双特異的分子の半分のみにある免疫グロブリン軽鎖の存在が迅速な分離方法を提供するからである。この手法はPCT出願公表WO94/04690(1994年3月3日公表)に開示されている。

双特異的抗体の作製に関するさらに詳細な事項は、例えばSureshなど、Methods in Enzymology、121巻：210頁(1986年)を参照すること。

ヘテロ複合抗体も本発明の範囲内にある。ヘテロ複合抗体は共有結合的に結合した抗体2個から構成される。このような抗体は例えば望ましくない細胞(米国

特許第4676980) およびHIV感染の処置 (PCT出願公表WO91/0360 およびWO92/200373; 欧州特許第03089) への免疫系細胞を目標として提案されている。ヘテロ複合抗体は便利な交差結合法のいずれかを使用して製造しうる。適当な交差結合試薬は当業界でよく知られており、米国特許第4676980には多数の交差結合技術とともに開示されている。

本発明に従って投与すべき好適なサイトカインはTNF- $\alpha$  および- $\beta$ 、IL-1、IFN- $\gamma$  の単独または所望の組合せいずれかである。これらのサイトカインは商業的に入手可能であるか、または在来源泉からの精製によって、組換えDNA技術の方法によって、化学的合成によって、またはこれらおよび/または他の既知技術の組合せによって製造できる。トロンビンの不活性アミノ酸配列変異体の製造に関連して記載したものと同じ技術はTNF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IFN- $\gamma$ などのような在来サイトカインのアミノ酸配列変異体を製造するために適当である。天然起源または既知変異体凝血促進性ペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸配列変異体は類似の様式によつても製造できる。

好適な態様においては、凝血促進剤またはトロンボモジュリン阻害剤およびサイトカインまたはサイトカイン産生誘導剤は全身的にまたは腫瘍の部位のいずれかに単回の投与で投与する。トロンボモジュリン阻害剤は好ましくは患者体内における阻害すべき物質のモル濃度に等しいか過剰な量を投与する。例えば、もしトロンボモジュリン阻害剤が活性部位遮断トロンビンであれば、これは患者血漿内のトロンボモジュリンのモル濃度と等しいかまたは過剰な量を投与するのが好ましい。正常ヒト個体のトロンボモジュリン血漿中濃度は典型的には約20ng/mlであるが、その一方で様々な病状においては約80ng/mlまで上昇することがある。同様に、もしトロンボモジュリン阻害剤がトロンビンのトロンボモジュリン結合部位を遮断することによって機能するならば、患者血漿内のトロンビンのモル濃度に等しいか、過剰な量を投与するのがよい。通常、中和すべき蛋白質について計算した量の約2倍から5倍モル過剰が好適である。

TNF- $\alpha$ はLD<sub>50</sub> 100 μg TNF- $\alpha$ /kg 体重の約5から10%に当るヒトでの用量または約5~10 μg TNF- $\alpha$ /kg 体重の用量でヒトに全身的

に投与しうる。しかしながら、さらに低いかまたは高い用量も有効であろうが、但し、高用量ではTNF- $\alpha$ の細胞障害性が処置の効果より重い負担にならないようとする。TNF- $\alpha$ は約1 $\mu\text{g}$ と200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ との間、好ましくは約25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 以下、の用量で腫瘍中に投与できる。典型的なTNF- $\beta$ の用量は同様であるが、しかしながら低毒性のためにヒトの療法におけるTNF- $\beta$ の用量は約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで増加でき、典型的には約50と80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ との間たとえば約60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ にすることができる。

動物実験はヒトの治療での有効用量決定について信頼できる指標を提供する。有効用量の種差スケーリングはMordenti, J. とChappelli, W. が「毒性動力学における種間スケーリングの使用 (The use of interspecies scaling in toxicokinetics)」[Yacobiなど編「毒性動力学および新薬開発 (Toxicokinetics and New Drug Development)」、Pergamon Press社、ニューヨーク、1989年、中の42~96頁]に発表した原理に従って実施できる。

本発明に従って投与される凝血促進剤、トロンボモジュリン阻害剤およびサイトカインの実際の治療的用量は、たとえば処置すべき腫瘍の型、患者の薬剤および病状のような様々なパラメーターの関数である。各病状に対する実際に投与する用量は臨床医の熟練の範囲内にある。

前記の通り、凝血促進剤またはサイトカインまたはサイトカイン産生導入剤の投与は同時的またはどちらかの薬剤を最初に投与する逐次的なこともある。同様にして、トロンボモジュリン阻害剤およびサイトカインまたはサイトカイン誘導剤は同時的またはいずれかの順序で逐次的に投与しうる。各薬剤は同一の医薬的組成物または別の医薬的組成物2個中に製剤化できる。治療用製剤は所期の純度を持つ活性成分を、要すれば生理学的に許容できる担体、添加剤または安定化剤 [Oslo, A. 編、「レミントンの医薬品科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、16版、1980年]とともに凍結乾燥製剤または水溶液の型に混合することによって貯蔵用に製造され

る。使用できる担体、添加剤または安定化剤は採用する用量および濃度でレシピエントに対して非毒性なものであり、磷酸塩、クエン酸塩およびその他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量ポリペプチド（約10残基またはそれ以下）；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのような蛋白質；ポリビニルピロリドンのような親水性高分子；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンのようなアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを包含する単糖類、二糖類およびその他の炭水化物；EDTAのようなキレート化剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような塩形成対イオン；および／またはトウイーン、プルロン剤またはPEGのような非イオン性界面活性剤を包含する。

生体内投与に使用する製剤は無菌でなければならない。これは凍結乾燥および再構築の前または後に無菌濾過膜を通過させる濾過によって容易に達成される。

これらの治療的組成物は一般に例えば皮下注射針で穿刺できる蓋を持つ静脈用溶液バッグまたはバイアルなど無菌アクセスポートを持つ容器中に入れる。

投与経路はたとえば静脈内、腹腔内、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内または病巣内の経路による注射または点滴、局所投与または持続放出系などによる今までに知られている方法に従う。

本発明の処置の効力は様々な生体内検査法によって監視できる。

#### 動物モデル

結果に再現性があって、合理的にヒトの臨床的場面に外挿できる動物モデルを選択する。

##### 1. 実験的腫瘍の処置

本発明の処置の生体内効果は種々の嚙齒類モデルにおける化学的に誘発した腫瘍を対象にして研究できる。例えばMeth-A、CMS 4、CMS 21およびWEHI-164は化学的に誘発したBALB/c雌性マウスの線維肉腫（Delle Leoなど、J. Exp. Med.、146巻：720頁〔1977年〕）であって、種々の薬剤の抗腫瘍活性を研究するために高度な制御が可能なモデル系を提供する（Palladinoなど、J. Immunol.、138巻：402

～4032頁〔1987年〕）。略述すれば、腫瘍細胞系列を試験管内で細胞培養によって増殖する。動物に注射する前に、細胞系列を緩衝液で洗浄して、約 $10 \times 10^6$ から $10 \times 10^7$ 細胞/ $\text{mL}$ の細胞密度で緩衝液中に懸濁する。次に動物の皮下にこの細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}$ から $200 \mu\text{L}$ を注射して1から3週間すると腫瘍が出現する。

これに加え、最も完全に研究された実験腫瘍であるマウスのルイス肺臓癌（3LL）を研究用の腫瘍モデルとして使用できる。この腫瘍モデルにおける効果は肺臓の小細胞癌（SCLC）と診断されたヒト患者の処置での有益な効果と関連付けられている。この腫瘍は感染マウスからの腫瘍断片の注射または培養液中に維持した細胞の注射によって正常なマウスに導入でき（Zupiなど、Brit. J. Cancer, 41巻：補4、309頁〔1980年〕）、証拠によれば腫瘍は1個の細胞の注射からでも発生し、注射した腫瘍細胞は非常な高率で生存する。この腫瘍モデルに関するこれ以上の情報についてはZacharski、Haemostasis, 16巻：300～320頁〔1986年〕）および下記の実施例1を参照すること。

## 2. 自然発生動物腫瘍の処置

生体内臨床研究のために適当な標的はネコの口腔扁平上皮細胞癌（SCC）である。ネコの口腔SCCは高度に侵襲的な悪性の腫瘍であって、この種について報告されている口腔腫瘍の60%以上に達し、ネコに最も多発する口腔悪性腫瘍である。これは極く希にしか遠隔部位に転移しないが、この転移発生率の低さはこの腫瘍を持つネコの生存期間の短さの反映に過ぎないかも知れない。主としてネコ口腔の解剖学的構造のためにこの腫瘍は通常は外科手術に適応しない。現在ではこの腫瘍に用いる有効な処置法はない。

本発明の処置の効果を検査するために最適の研究計画に従えば、ネコを無作為に4群に別ける。群1はトロンボモジュリン阻害剤とサイトカイン（またはサイトカイン産生誘導剤）との組合せで処置し、群2はサイトカイン単独で処置し、群3はトロンボモジュリン単独で処置し、群4は無処置（入手できる動物数が限定されるためこの群を加えるのは実際的でないかも知れない）とする。研究に着

手する前に各ネコに完全な臨床的試験、生検を行い、コンピュータートモグラフィー（CT）により走査する。舌下口腔扁平上皮細胞腫瘍と診断されたネコは研究から除外する。この腫瘍のために舌が麻痺し、処置で腫瘍を殺したとしても、動物は自分で摂食できないこともある。各ネコを5日間の期間にわたって3回処置する。処置期間および後続する再検査時に腫瘍の写真を毎日撮影する。処置後に、各ネコをCT走査にかける。その後8週毎にCT走査と胸部X線撮影とを評価する。2群間の生存率、反応および毒性の相違についてデータを評価する。陽性反応には腫瘍の後退、好ましくは生活の質の改善および／または寿命の増加が必要である。

これに加え、本明細書に開示する処置の効果は、たとえばイヌ、ネコおよびヒヒの線維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫、平滑筋肉腫のような他の自然発生的動物腫瘍について検査しうる。イヌおよびネコにおける乳腺癌はその徴候と性質とがヒトのものに非常に類似しているので、好適なモデルである。しかしながら、動物にこの型の腫瘍が発生するのは希なのでこのモデルの使用は限定される。

他の凝血促進剤とサイトカインとの組合せの効果は類似の試験計画を使用して同じ動物モデルについて検査される。

#### ヒトでの臨床試験

ヒトでの臨床実験は好ましくは頭部または頸部の癌と診断された患者で行う。これらの癌は通常過剰な喫煙またはアルコール乱用に関連しているが米国における全癌の約4～5%を占める。約95%ではそれらは扁平上皮内皮から発生した扁平上皮細胞癌または皮下癌である。疼痛、嗄声、嚥下困難などの局所的徴候のため、これらの腫瘍は通常早期の段階で診断され、典型的には遠距離の転移を伴わない。頭部または頸部の癌は最近では外科手術および放射線療法および／または化学療法によって処置される。予後は比較的劣悪であって、腫瘍の位置に依存して典型的には患者の10%が外科手術後5年またはそれ以上生存する。

ヒトでの臨床試験の効果には腫瘍の後退、好ましくは生活の質の向上および／または寿命の増加を伴うことが証明される必要がある。

本発明の処置にはたとえば放射線療法、化学療法およびBurrowsとTh

o r p e、前出、によって記載されたような腫瘍の脈管構造に指向するイムノトキシンの投与を含むイムノトキシン療法のような既に知られている腫瘍療法と組合せることもある。最も好ましくは、本発明の処置は例えばプロテインCまたは活性化プロテインCに対する抗体、プロテインSに対する抗体、不活性化プロテインCおよび米国特許第5147638に記載されているC4b結合蛋白質などでありうるプロテインC系阻害剤（別種の）の投与と組合わせる。これに加え、血小板の喪失を低減または抑制するステロイドまたはその他の知られている薬剤を処置前、処置中または処置後に投与しうる。

本発明のさらに詳細な事項は以下の非限定的な実施例から明白になると思われる。

#### 実施例1

##### 不活性化トロンビンとTNF- $\beta$ との組合せによるマウス大型固形腫瘍の処置 トロンビンの不活性化

PPACK (Syn·Organon·Chemica·Alta社) を10 mM-HClに溶解して最終濃度5mg PPACK/mLとした。トロンビン濃度を1から5mg/mLの間で変えた種々の製剤を作成した。ヒトおよびウシ双方のトロンビンを薬剤として使用した。不活性のために使用した緩衝液は0.5M-NaClを含有する50mM-HEPES、pH 6.5か、0.15M-NaClを含有する25mM-トリス、pH 7.5かの何れかから構成されていた。トロンビンに10倍モル過剰のPPACKを添加した。溶液を室温で3から4時間おだやかに攪拌した。残留するPPACKを小容量づつAmicon攪拌細胞濃縮装置を使用するダイアフィルトレーションを反復することによって除去し、Centricon10マイクロコンセントレーター中に入れた。この薬剤をPPACK-トロンビン最終濃度約10mg/mLとした。緩衝液および装置の全てをエンドトキシン不含とすることに注意を払った。

##### 処置および腫瘍の反応の評価

腫瘍の反応はマウスで背面スキンフォールドチャンバー (Leuning, M. など、Cancer Res.、52巻：6553～6560頁 [1992年]

; Lehr, H. など、Am. J. Pathol.、143巻：1055～1062頁[1993年]）を使用して評価した。この操作法では正常な皮下の皮膚組織および移植した腫瘍の双方の血管を連続的に観察することができる。

略述すれば、背面スキンフォールドチャンバーをCD6/F1マウスに埋没した。これらチャンバーを埋没してから2～3日後に直径約 $700\mu\text{m}$ のルイス肺臓細胞癌腫瘍スフェロイドをこれらのチャンバーに移植した。腫瘍移植の約1週間後に広範囲に脈管構造の網状組織が形成され、マウスを倒立顕微鏡のスタンドに装着した。

容積 $200\mu\text{l}$ を越えない容量で、化合物を単独または組合せて尾部静脈注射によって投与した。TNF- $\beta$  (LT) (大腸菌からの組換え生成物、Genentech社、サウスサンフランシスコ、CA) は $7\mu\text{g}/\text{マウス}$ の用量で使用し、活性部位遮断トロンビン (ABT) を $1\text{mg}/\text{マウス}$ の用量で使用した。

注射後最初の1時間、及び後続する24時間では毎時間1回反応を連続的に観察した。被験物質の投与前に静脈注射したアクリジンオレンジによって白血球輸送のコントラストが強調された。観察結果はVHSビデオカセットレコーダーに記録して、後にオフラインで分析した。

図2は処置後様々な時点における $7\mu\text{g}$ のヒトTNF- $\beta$ と $1\text{mg}$ の活性部位遮断ウシトロンビンとの混合物の投与の結果を示す。（同様な結果は活性部位遮断ヒトトロンビンでも得られた）。実際の時点は図2のA～Dの左下端に示す。図2Aは処置前の腫瘍ネオ脈管構造を約 $10\times$ の倍率で示す。図2B（倍率 $10\times$ ）に示すように、処置の6.5時間後には腫瘍中に浮腫の増加が現れた。これに加えてこの時点ではビデオ上では実際に血流は停滞して見えた。図2Cの写真は処置23時間後に撮影し、 $4\times$ の倍率で示す。この図は腫瘍があった場所（黒い場所）、腫瘍の脈管構造が完全に除去されたこと、ならびに腫瘍の場所にある隣接する前から存在した血管を示す。図2Dの写真は同じ動物の第二の腫瘍部位で図2Cの写真撮影より25分前に撮影したもので、約 $1.6\times$ の倍率で示す。この部位では図2Cに示した部位と同じ現象（脈管構造崩壊、隣接する血管も含む）が起きていた。この写真は正常組織（図2Cおよび図2Dの左下部分）がこ

の治療法によって影響を受けなかったことも示す。実際、ビデオカメラによる観察に従えば、正常組織は全観察時間を通じて正常な血流を維持した。TNF- $\beta$ （動物2匹で試験）またはASBT（動物3匹で試験）いずれか単独での処置はいかなる時点においても腫瘍血流または浮腫には何の効果を示さなかった。

2回目の研究は2mg/マウス用量のヒトのASBTを7 $\mu$ g/マウスの用量のTNF- $\beta$ と組合せ、その他は同一の条件で行ったが、ここでも腫瘍脈管構造の崩壊が起きた。

### 実施例2

#### 活性部位遮断トロンビンおよびTNF- $\beta$ による口腔扁平上皮細胞癌を持つネコの処置

組織学的に口腔内の扁平上皮細胞癌（SCC）を確認されたネコを活性部位遮断トロンビンとTNF- $\beta$ とを導入する実験計画に沿って処置する。処置前に動物は全部を世界保健機構の指針に従って段階付ける。処置の実験計画では5~7日間にわたって3回の処置を行う。

各ネコを施設に入れ、好ましくは頸静脈を中心カテーテルを装着する。これらの内在カテーテルは全処置期間中、開放系を維持できるような方法で固定する。各ネコに個々に指定された体力保持の処置をする。これに限定されるものではないが、この体力保持の処置は静脈内液体体力保持剤、静脈内抗生物質および経口体力保持剤を包含する。

活性部位遮断トロンビンを実施例1に記載したようにして調製して約30mg/kgの用量で投与する。TNF- $\beta$ の用量は所定の増加様式に基づいて3、5および10 $\mu$ g/kgと増加させる。TNF- $\beta$ は無菌食塩水で希釈してBuretrol（商標）（Add-On・Set、Baxter・Healthcare社、ディアフィールド、イリノイ州、米国）IV投与システムに注入する。TNF- $\beta$ の希釈に使用する食塩水の量は投与するTNF- $\beta$ の量に応じて25~50mLである。正常ネコ血漿（0.5~1mL）を食塩水に添加して静脈内投与装置および管のプラスチックへのTNF- $\beta$ 付着を防止する。活性部位遮断トロンビンとTNF- $\beta$ とは静脈内に同時に投与するかまたは任意の順序で順次

【図 1】

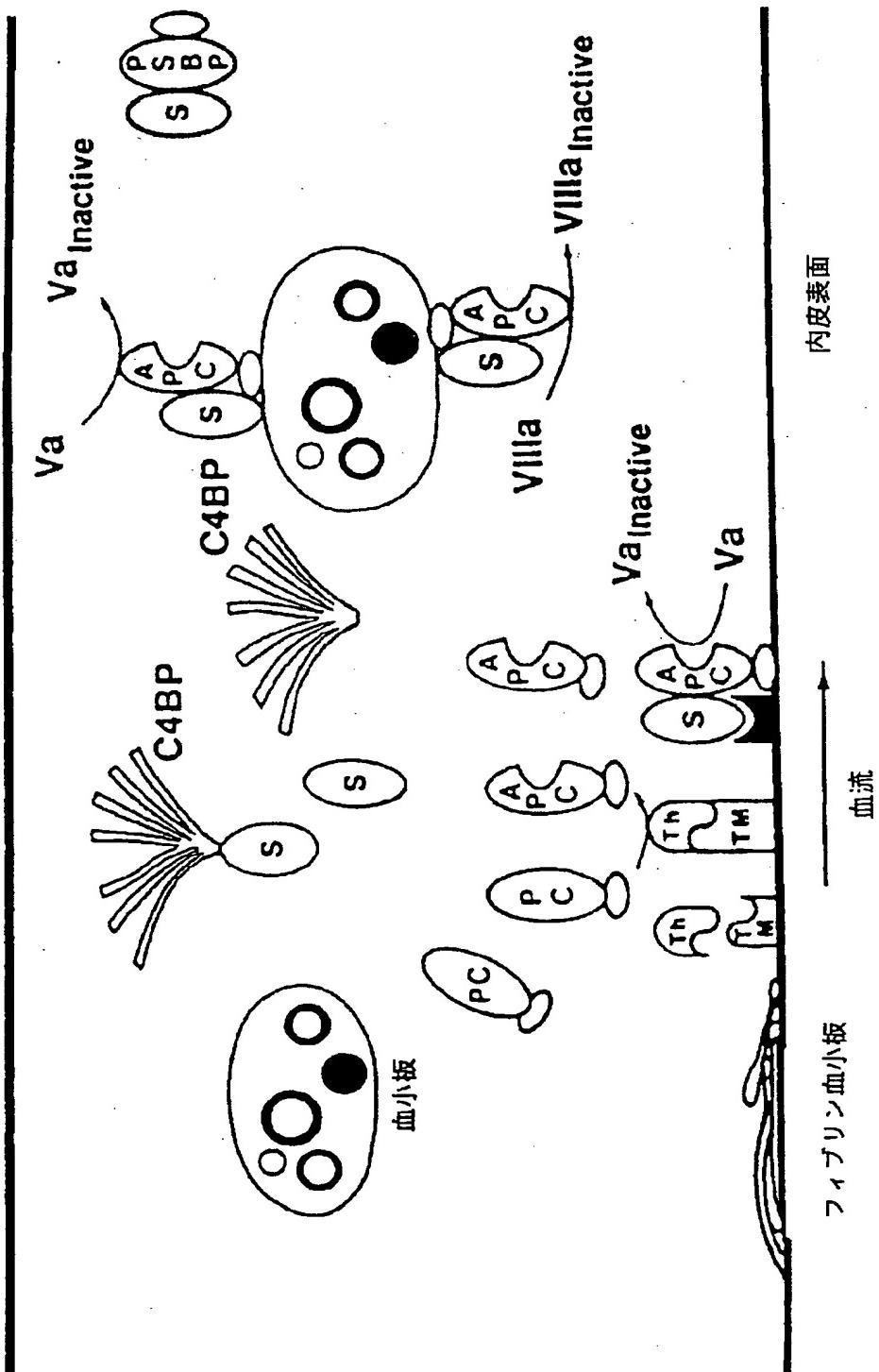


FIG. 1

に投与しうるが、しかしながら TNF- $\beta$  を先に投与することが最大効果を得るために好ましいと信じられる。

### 実施例3

#### 凝血促進剤と TNF- $\beta$ との組合せによるマウス大型固形腫瘍の処置

動物モデルを使用し、実施例1に記載した実験計画に従って、ルイス肺臓細胞癌腫瘍を埋没した CD 6/F 1 マウス 6 匹の各々に 5  $\mu$  g/マウス用量の第 I X a 因子を 7  $\mu$  g/マウス用量の組換え TNF- $\beta$  (Genentech 社で大腸菌中に產生したもの) と組合せて投与した。処置した 6 匹の動物の中で 5 匹では完全で選択的な腫瘍脈管構造崩壊を示した。

同様な実験で、腫瘍を持つ CD 6/F 1 マウス 5 匹を 5  $\mu$  g/マウスの用量の組織因子と 7  $\mu$  g/マウスの用量の TNF- $\beta$  との組合せで処理した。動物 4 匹は急速で選択的な腫瘍脈管構造の崩壊を示した。血流は投与後約 2 時間ですでに閉塞し始めた。

明細書全体にわたる引用文献全部の開示およびそこに引用されている参考文献は全てここに参考のために明示的に引用するものである。

前記は特定の好適な態様に言及しているけれども、本発明はそれに限定するものではないことを理解すべきである。通常の当業者は本発明の着想全体から逸脱せずに開示した態様に対する様々な修飾を行いうると思われる。そのような修飾は全部が本発明の範囲内にあるものと意図されている。

**BEST AVAILABLE COPY**

【図2】



FIG. 2B

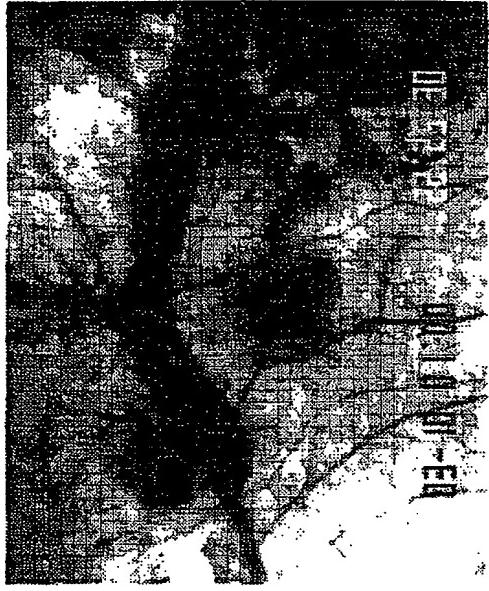


FIG. 2D



FIG. 2A

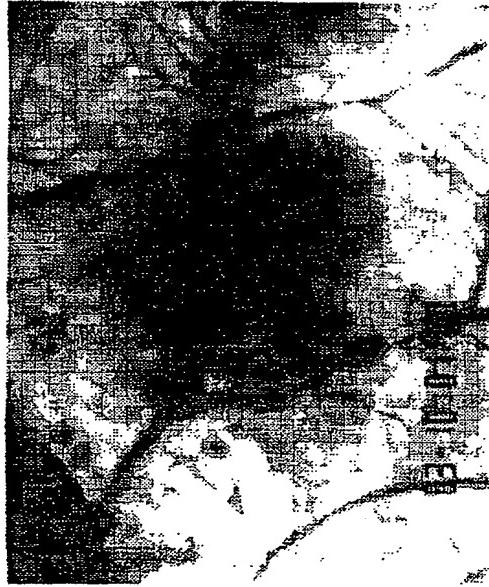


FIG. 2C

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

'Intern' 1 Application No  
PCT/US 95/07305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K38/48 C07K16/40 // (A61K38/48, 38:19), (A61K38/48, 38:20), (A61K38/48, 38:21)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BLOOD, vol.83, no.1, 1 January 1994 pages 152 - 160 IRIS SCHWAGER ET AL. 'EFFECT OF HUMAN RECOMBINANT CYTOKINES ON THE INDUCTION OF MACROPHAGE PROCOAGULANT ACTIVITY.' see the whole document	1-24
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), vol.266, 25 June 1991, BALTIMORE, MD US pages 12067 - 12074 PIM N. M. TIJBURG ET AL. 'ACTIVATION OF THE COAGULATION MECHANISM ON TUMOR NECROSIS FACTOR-STIMULATED CULTURED ENDOTHELIAL CELLS AND THEIR EXTRACELLULAR MATRIX.' see the whole document	1-28
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  6 October 1995		Date of mailing of the international search report  09.11.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-2016		Authorized officer  Rempp, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor / Application No  
PCT/US 95/07305

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	ANTICANCER RESEARCH, vol.14, no.6B, November 1994 pages 2573 - 2576 FUSAKO NISHIGAKI ET AL. 'ROLE OF TISSUE FACTOR IN THE ANTITUMOR EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN MICE.' see the whole document	1,2,23
A	WO,A,90 00400 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 25 January 1990	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US95/07305****Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 19(3)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Remark: Although claims 1-22 are directed to a method of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition**
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Internat'l Application No  
**PCT/US 95/07305**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WD-A-9000400	25-01-90	AU-B-	630106	22-10-92
		AU-B-	4034889	05-02-90
		EP-A-	0378676	25-07-90
		JP-T-	3501620	11-04-91

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
A 6 1 K 38/48		9358-4B	C 1 2 P 21/08	
	38/55	9051-4C	A 6 1 K 37/02	
	39/395	9051-4C	37/64	
	45/00	9051-4C	37/547	
C 0 7 K 16/18		9051-4C	37/54	
	16/40	9051-4C	37/66	
C 1 2 N 5/10		9051-4C	37/24	
	15/02	9282-4B	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 P 21/08		9735-4B	5/00	B

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG  
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN  
, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG)  
, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C  
H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB  
, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR  
, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, M  
N, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU  
, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT  
, UA, UG, UZ, VN